



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

ANALYSE VON FLAVONOIDEN IM HONIG

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

an der

Fakultät für Chemie,
Universität Wien

Verfasser:	Karoline Petrus
Matrikelnummer:	0001204
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Chemie
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Margit Cichna-Markl

Wien, im Juni 2009

1	EINLEITUNG.....	8
2	POLYPHENOLE	9
2.1	Flavonoide.....	9
2.1.1	Wichtige Flavonoidfamilien	11
2.1.1.1	Flavone	11
2.1.1.2	Flavonole	11
2.1.1.3	Flavanone	12
2.1.1.4	Flavanole	12
2.1.1.5	Anthocyane	13
2.1.1.6	Isoflavone	13
2.1.2	Funktion der Flavonoide in Pflanzen.....	14
2.1.2.1	Funktionen der Anthocyane	14
2.1.2.2	Funktionen der farblosen und gelben Flavonoide	15
2.1.3	Flavonoide und Gesundheit	17
2.1.3.1	Flavonoide als Antioxidantien, Radikalfänger und Chelatbildner	17
2.1.3.2	Flavonoide und Krebs.....	19
2.1.3.3	Flavonoide und Herz-Kreislauf -Erkrankungen	20
2.1.3.4	Entzündungshemmende Wirkung von Flavonoiden.....	20
2.1.3.5	Präbiotische Wirkung von Flavonoiden	20
2.1.3.6	Antivirale Wirkung von Flavonoiden	21
2.1.3.7	Krampflösende Wirkung von Flavonoiden	21
2.1.3.8	Östrogene Wirkung von Flavonoiden	21
2.1.3.9	Einfluss von Flavonoiden auf das Immunsystem	21
2.1.3.10	Negative Effekte	22
2.1.4	Beschreibung der verwendeten Flavonoide.....	22
2.1.4.1	Myricetin	22
2.1.4.2	Quercetin	23
2.1.4.3	Naringenin	23
2.1.4.4	Luteolin	24
2.1.4.5	Hesperetin	24
2.1.4.6	Kämpferol	24
2.1.4.7	Isorhamnetin	25
2.1.4.8	Apigenin.....	25
2.1.4.9	Pinocembrin.....	26
2.1.4.10	Chrysin	26
2.1.4.11	Galangin	27
2.1.4.12	Acacetin.....	27
3	HONIG.....	28

3.1	Entstehung, Gewinnung und Verarbeitung	28
3.2	Zusammensetzung	30
3.2.1	Kohlenhydrate	30
3.2.2	Wasser	31
3.2.3	Enzyme	31
3.2.4	Aminosäuren und Proteine.....	31
3.2.5	Säuren.....	32
3.2.6	Aromastoffe	32
3.2.7	Mineralstoffe.....	32
3.2.8	Fettsäuren	33
3.2.9	Vitamine	33
3.2.10	Cholin und Acetylcholin	33
3.2.11	5-Hydroxymethyl-Furfural (HMF)	33
3.2.12	Osmophile Hefen	33
3.2.13	Honigsedimente	34
3.2.14	Pollenkörner.....	34
3.2.15	Propolis	34
3.2.16	Polyphenolische Verbindungen	35
3.2.17	Toxische Honiginhaltsstoffe.....	35
3.2.18	Unerwünschte Inhaltsstoffe	35
3.2.18.1	Mikroorganismen.....	35
3.2.18.2	Bienenarzneimittel.....	36
3.2.18.3	Pestizide	36
3.2.18.4	Schwermetalle.....	37
3.3	Honigarten.....	38
3.3.1	Unterscheidung nach der Gewinnungsart.....	38
3.3.2	Unterscheidung nach der Pflanzenherkunft.....	39
3.3.3	Unterscheidung nach dem Verwendungszweck	39
3.3.4	Unterscheidung nach der Eintragszeit	39
3.4	Honig als Heilmittel	40
3.5	Honigcharakterisierung	41
3.5.1	Sortenreinheit: botanischer und geographischer Ursprung	42
3.5.2	Verfälschung	42
3.5.3	Analysenmethoden	43
3.5.3.1	Physikochemische und mikroskopische Methoden.....	43
3.5.3.2	Pollenanalyse	43
3.5.3.3	Zucker (Kohlenhydrate)	44
3.5.3.4	Aminosäuren und Proteine	45

3.5.3.5	Aromastoffe	46
3.5.3.6	Enzymaktivität	47
3.5.3.7	Fermentationsprodukte.....	47
3.5.3.8	Mineralstoffe und Spurenelemente	47
3.5.3.9	Aliphatische organische Säuren.....	48
3.5.3.10	Phenolische Verbindungen (außer Flavonoide).....	48
3.5.3.11	Hauptisotope	49
3.5.3.12	Mögliche Markersubstanzen	49
3.6	Flavonoidanalytik in Honig.....	51
3.6.1	Probenvorbereitung.....	51
3.6.2	Chromatographische Methoden.....	53
3.6.3	Elektrophoretische Methoden	56
3.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	57
4	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	58
4.1	Aufarbeitung der Honigproben	58
4.1.1	Accelerated Solvent Extraction (ASE)	58
4.1.2	Amberlite XAD-2-Harz.....	59
4.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	61
4.2.1	Grundlagen.....	61
4.2.2	Aufbau einer HPLC-Apparatur	62
4.2.3	„Reversed Phase“-Chromatographie	63
4.2.4	Chromatographische Parameter	64
4.3	Coulometrischer Elektroden-Array-Detektor (CEAD)	68
4.3.1	Grundlagen.....	68
4.3.2	Elektroden	68
4.3.3	Strom-Spannungskurven	69
4.3.4	Quantitative Information	70
4.4	Massenspektrometrie (MS).....	71
4.4.1	Probeneinlasssystem und Ionenquelle	72
4.4.1.1	Elektrospray-Ionisation (ESI).....	73
4.4.2	Massenanalysatoren	74
4.4.2.1	Ionenfalle	75
4.4.3	Detektor.....	76

5	MATERIAL UND METHODEN.....	77
5.1	Verwendete Chemikalien und Gebrauchsmaterialien	77
	Herstellung der Lösungen	79
5.1.1	Lösungen für die HPLC-CEAD.....	79
5.1.1.1	Laufmittelgemische:.....	80
5.1.2	Lösungen für die Extraktion	83
5.1.2.1	Methode 1: ASE-Extraktion	83
5.1.2.2	Methode 2: Extraktion über die Polyamidsäule.....	83
5.1.2.3	Methode 3: Extraktion über Amberlite XAD-2-Harz	84
5.1.3	Lösungen für die HPLC-MS	84
5.2	Liste der Honigproben	85
5.3	Verwendete Geräte	86
5.3.1	Allgemeine Laborausrüstung	86
5.3.2	HPLC-CEAD.....	86
5.3.3	HPLC-MS	87
5.4	Entwicklung einer Methode zur Trennung und Detektion von Standardsubstanzen mittels HPLC-CEAD	88
5.4.1	Isokratische Elution	88
5.4.2	Gradientenelution	89
5.4.3	Stom-Spannungskurven.....	90
5.4.4	Eichgeraden, Bestimmung der Nachweis- und der Erfassungsgrenzen	90
5.4.5	Linearer Bereich.....	91
5.4.6	Bestimmung der Reproduzierbarkeit	91
5.5	Entwicklung einer Extraktionsmethode	92
5.5.1	Extraktion mittels ASE.....	92
5.5.1.1	Probenvorbereitung	92
5.5.1.2	Suche nach einem geeigneten Extraktionsmittel und der geeigneten Extraktionstemperatur.....	92
5.5.1.3	Weiterverarbeitung der Extrakte.....	93
5.5.1.3.1	Extrakte mit wasserfreiem Extraktionsmittel	93
5.5.1.3.2	Extrakte mit Wasser im Extraktionsmittel.....	93
5.5.1.4	Ermittlung der Extraktionsausbeute	94
5.5.2	Extraktion mittels Polyamid	94
5.5.2.1	Extraktion von Honigproben	94
5.5.2.2	Weiterverarbeitung der Extrakte.....	95
5.5.2.3	Ermittlung der Extraktionsausbeute	95

5.5.2.4	Extraktion einer Flavonoidstandard-Mischung	95
5.5.2.4.1	Methoden zur Entfernung des Lösungsmittels	96
5.5.3	Extraktion mittels Amberlite XAD-2-Harz	96
5.5.3.1	Extraktion.....	96
5.5.3.2	Weiterverarbeitung der Extrakte.....	97
5.5.3.3	Ermittlung der Extraktionsausbeute	97
5.6	Entwicklung einer Methode zur Trennung und Detektion von Flavonoiden in Honig	
mittels HPLC-CEAD	98	
5.6.1	Anpassung der Gradientenelution	98
5.6.2	Wiederfindung mittels Standardaddition	98
5.6.2.1	Einfluss der Konsistenz auf die Wiederfindung.....	99
5.6.3	Nachweisgrenze und Erfassungsgrenze	99
5.7	Qualitative Untersuchung der Honigproben mittels HPLC-MS	100
6	ERGEBNISSE	102
6.1	Entwicklung einer Methode zur Trennung und Detektion von Flavonoiden in	
Standardlösungen mittels HPLC-CEAD	102	
6.1.1	Chromatographische Trennung	102
6.1.2	Coulometrische Elektroden-Array-Detektion.....	103
6.1.3	Eichgerade, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze	105
6.1.4	Linearer Bereich	107
6.1.5	Reproduzierbarkeit.....	107
6.1.6	Zusammenfassung der experimentellen Daten und Ergebnisse	108
6.1.6.1	Trennung und Detektion	108
6.1.6.2	Optimaler Detektionskanal, Nachweisgrenzen, Erfassungsgrenzen, Reproduzierbarkeit.....	109
6.2	Entwicklung einer Extraktionsmethode	110
6.2.1	Extraktion mittels ASE.....	110
6.2.2	Extraktion mittels Polyamid	111
6.2.3	Extraktion mittels Amberlite XAD-2-Harz	112
6.3	Entwicklung einer Methode zur Trennung und Detektion von Flavonoiden in Honig	
mittels HPLC-CEAD	114	
6.3.1	Optimierung des Gradientenprogramms für Realproben.....	114
6.3.2	Identifizierung der Flavonoide	115
6.3.3	Wiederfindung mittels Standardaddition	116
6.3.4	Nachweis- und Erfassungsgrenze.	118
6.3.5	Reproduzierbarkeit.....	118
6.3.6	Darstellung einiger Chromatogramme	119

6.3.7	Zusammenfassung der experimentellen Daten und Ergebnisse zur Trennung von Flavonoiden in Honigproben	124
6.3.7.1	Trennung und Detektion	124
6.3.7.2	Optimaler Detektionskanal, Nachweisgrenzen, Erfassungsgrenzen, Reproduzierbarkeit.....	125
6.4	Qualitative Untersuchung der Honigproben mittels HPLC-MS	126
6.5	Quantitative Analyse der Honigproben mittels HPLC-CEAD.....	130
7	DISKUSSION	132
7.1	Vergleich der Flavonoidkonzentrationen der untersuchten Honigproben.....	132
7.2	Vergleich der Ergebnisse mit anderen Publikationen	135
7.2.1	Aufarbeitung.....	135
7.2.2	Charakteristische Flavonoide.....	135
8	ANHANG.....	139
8.1	Zusammenfassung.....	139
8.2	Abstract	141
8.3	Lebenslauf.....	143
8.4	Abkürzungsverzeichnis	145
8.5	Abbildungsverzeichnis	148
8.6	Tabellenverzeichnis	150
8.7	Literaturverzeichnis	151

1 EINLEITUNG

Die EU-Richtlinie 74/409/EEC legt allgemeine Regeln für die Zusammensetzung und Herstellung von Honig fest. Sie erlaubt die Angabe des botanischen Ursprungs, wenn das Produkt hauptsächlich aus der angegebenen Quelle stammt und ihre organoleptischen, physikochemischen und mikroskopischen Eigenschaften besitzt. Sie gestattet die Angabe der regionalen, territorialen oder topographischen Herkunft, wenn es ausschließlich aus diesem Gebiet stammt und die Auflistung besonderer Qualitätskriterien. Die Angabe des Ursprungslandes ist für alle Hersteller verpflichtend. In Österreich werden Bezeichnung und Zusammensetzungsmerkmale durch die Honigverordnung [1] geregelt. Die Honigverordnung ist die Umsetzung der Richtlinie 2001/110/EG des EU-Rates [2].

Um die Einhaltung der Richtlinie überprüfen zu können, braucht man geeignete Analysemethoden. Für die Bestimmung der Sortenreinheit und der botanischen Herkunft verwendet man derzeit die Pollenanalyse, die aber einige Nachteile hat, wie z.B. dass sie bisher nicht computergestützt durchgeführt werden kann. Daher versucht man andere Methoden zu entwickeln, um Honigsorten identifizieren zu können. Im Fokus dieser Methoden stehen verschiedene Substanzen, die von den Pflanzen stammen, von denen die Bienen Nektar oder Honigtau sammeln. Zu diesen Substanzen zählen z.B. Aminosäuren, organische Säuren, Aromastoffe und phenolische Verbindungen, wie die Flavonoide.

Flavonoide sind polyphenolische Pflanzenpigmente, die man in Obst, Gemüse, Nüssen, Samen, Blumen und allen grünen Pflanzenzellen findet. Sie sind für die brillanten Farben von Blütenblättern und Früchten genauso verantwortlich wie auch für komplexe, fluoreszierende Muster, die unter UV-Licht sichtbar werden. Sie sind als Antioxidantien, Radikalfänger und Chelatbildner bekannt und sie werden mit einer Reihe von biologischen Effekten, wie z.B. antiviraler, antibakterieller und entzündungshemmender Wirkung, in Verbindung gebracht [3, 4].

In den Honig können Flavonoide über Nektar, Pflanzensekrete, Pollen oder Propolis gelangen. Daher sollte das Flavonoidprofil einer Honigprobe die botanische Quelle ihres Blütennektars widerspiegeln. Dieses Profil wird aber je nach Pollen- und Propolisquelle, und damit je nach geographischer Herkunft verändert.

2 POLYPHENOLE

Polyphenole werden entsprechend der Zahl ihrer Phenolringe und deren Verknüpfung in Hydroxybenzoesäuren (Gallussäure), Hydroxyzimtsäuren (Kaffee-, Ferulasäure), Stilbene, Chalcone, Flavonoide und Lignane (Pinoresinol, Lariciresinol) eingeteilt. In pflanzlichen Lebensmitteln wurden mehrere hundert nachgewiesen und sie liegen meistens als Glykoside, seltener als Ester vor. Sie tragen oft zu Farbe und Aroma von Früchten bei. Sie sind aber auch Substrate für Polyphenoloxidasen, deren Produkte unter anderem zur enzymatischen Bräunung von Obst beitragen. Allen gemeinsam ist die antioxidative Wirkung, die aber stark vom pH-Wert und vom Hydroxylierungsmuster abhängig ist [5].

2.1 Flavonoide

Die Substanzklasse der Flavonoide wurde in den 1930er Jahren von Albert Szent Györgyi entdeckt. Sie sind die in der Nahrung am häufigsten vertretenen Polyphenole, es sind über 6500 davon bekannt.

Ihr Grundgerüst ist der Flavankern (Abbildung 1), der aus 15 Kohlenstoffatomen besteht, die in 3 Ringen angeordnet sind ($C_6-C_3-C_6$), zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen (C). Sie werden anhand ihres C_3 -Elements in Gruppen eingeteilt, wie z.B. Flavone, Flavonole, Flavanone, Flavanole, Anthocyane, Isoflavone, Chalcone, Dihydrochalcone, Aurone, Cumarine und Proanthocyanidine (siehe Kapitel 2.1.1) [6, 7].

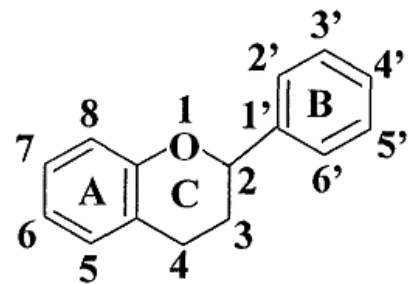


Abbildung 1: Flavankern

Flavonoide haben einen gemeinsamen Biosyntheseweg, die Vorstufen stammen aus dem Shikimisäure- und dem Acetat-Malonat-Stoffwechsel [8].

In Pflanzen kommen sie, mit Ausnahme der Flavanole, meist glykosyliert vor, von Quercetin wurden bisher etwa 180 Glykoside entdeckt. Die bevorzugte Bindungsstelle für den Zuckerrest ist die 3-Position, aber es können auch an die Positionen 5 und 7 Zucker gebunden werden. Es handelt sich hauptsächlich um

O-Glykoside, aber es sind auch C-Glykoside bekannt, bei denen der Zucker direkt an den aromatischen Ring gebunden ist. Der häufigste Zuckerrest ist D-Glukose, aber auch D-Galaktose, L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Xylose und Apiose kommen an Aglykone gebunden vor. Im Allgemeinen sind D-Zucker β -glykosidisch und L-Zucker α -glykosidisch gebunden [9, 10]. Glykosylierung macht sie besser wasserlöslich und weniger reaktiv gegenüber freien Radikalen [8].

Angaben über die tägliche Aufnahme variieren stark. In einer Studie aus Amerika aus dem Jahr 1976 wird ein täglicher Flavonoidkonsum von 1 g angegeben. Dieser Wert ist aber nach heutiger Ansicht zu hoch, da ungeeignete Analysemethoden verwendet wurden. In einer niederländischen Studie, die 1987/88 durchgeführt wurde, hat man die Zufuhr im Durchschnitt auf 23 mg pro Person und Tag geschätzt (3-65 mg/Tag). Dabei wurden der Gehalt von drei Flavonolen und zwei Flavonen in 28 Gemüsesorten, 9 Früchten und einigen Getränken und der Konsum dieser Lebensmittel untersucht. Da nur 5 Flavonoide berücksichtigt wurden, liegt die tatsächliche tägliche Aufnahme wahrscheinlich über diesem Wert [3]. Bei der Zutphen Elderly Study wurde eine durchschnittliche Catechinzufuhr von 75 mg pro Tag beobachtet [10].

Ein weiteres Problem bei der Abschätzung der Flavonoidzufuhr ist, dass Umweltfaktoren, regionale Unterschiede, Wachstumsbedingungen, Charakteristika der verschiedenen Unterarten und Vorgänge bei Lagerung und Verarbeitung den Flavonidgehalt von Lebensmitteln beeinflussen [11].

Über die Aufnahme, die Metabolisierung und die Ausscheidung von Flavonoiden ist nur wenig bekannt. Bei der Verstoffwechslung sind Umwandlungen, wie die Abspaltung von Zuckern und/oder phenolischen Hydroxylgruppen, Ringöffnung, Hydrogenierung und Abbau zu Kohlendioxid möglich [3, 7].

Aus ernährungsphysiologischer Sicht bleibt die Bedeutung der Flavonoide unklar. Anders als bei bekannten Mikronährstoffen, wie den Vitaminen, führt eine zu geringe Zufuhr an Flavonoiden nicht zu offensichtlichen Mangelerscheinungen [11].

2.1.1 Wichtige Flavonoidfamilien

2.1.1.1 Flavone

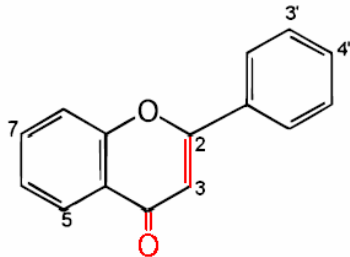


Abbildung 2: Grundstruktur der Flavone

Substanz	Position			
	5	7	3'	4'
Luteolin	OH	OH	OH	OH
Apigenin	OH	OH		OH
Chrysin	OH	OH		

Flavone haben eine Doppelbindung an der 2-3-Position des heterozyklischen Rings. Man findet diese hellgelben Pigmente am häufigsten in Früchten, aber auch in Getreide und Kräutern. Am weitesten verbreitet sind Apigenin und Luteolin. Wenn sie in hohen Konzentrationen vorkommen oder Metallionen komplexieren, tragen Flavone zur Farbe von pflanzlichen Geweben bei.

Flavone tragen auch zum Geschmack bei, so sind die Aglykone Nobiletin, Sinensetin und Tangeretin Bitterstoffe in Zitrusfrüchten. Die Glykoside Neodiosmin und Rhoifolin reduzieren den bitteren Geschmack von Substanzen [12].

2.1.1.2 Flavonole

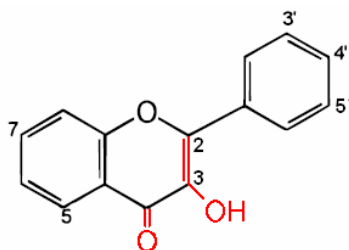


Abbildung 3: Grundstruktur der Flavonole

Substanz	Position				
	5	7	3'	4'	5'
Quercetin	OH	OH	OH	OH	
Kämpferol	OH	OH		OH	
Galangin	OH	OH			
Fisetin		OH	OH	OH	
Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH

Flavonole haben dieselbe Grundstruktur wie Flavone mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe am C-Ring. Sie sind hellgelbe Pigmente, die in allen pflanzlichen Lebensmitteln und in Früchten meistens in der Schale vorkommen. Die häufigsten Vertreter sind Quercetin und Kämpferol [12].

2.1.1.3 Flavanone

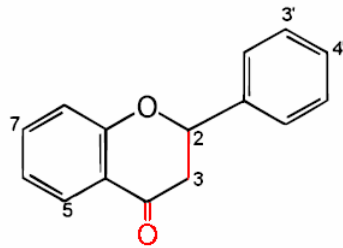


Abbildung 4: Grundstruktur der Flavanone

Substanz	Position			
	5	7	3'	4'
Naringenin	OH	OH		OH
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃

Flavanone haben im Gegensatz zu den Flavonen keine Doppelbindung im heterozyklischen Ring. Sie sind nur in wenigen Lebensmitteln vertreten. Man findet sie hauptsächlich in Zitrusfrüchten und daraus hergestellten Säften, aber auch in Kichererbsen, Kreuzkümmel, Weißdorn- und Vogelbeeren, Süßholz und Pfefferminze. Sie tragen zum Geschmack der Zitrusfrüchte bei. Flavanone mit Neohesperidose als Zuckerrest schmecken normalerweise bitter, wie z.B. Naringin in der Grapefruit [12].

2.1.1.4 Flavanole

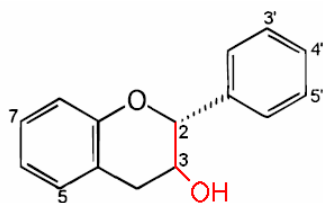


Abbildung 5: Grundstruktur der Catechine

Substanz	Position					
	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-Catechin	βOH	OH	OH	OH	OH	
(-)-Epicatechin	αOH	OH	OH	OH	OH	
(-)-Epigallocatechin	αOH	OH	OH	OH	OH	OH

Man nennt Flavanole auch Flavan-3-ole oder Catechine. Ihnen fehlt die Ketogruppe am und die Doppelbindung im heterozyklischen Ring. Die fehlende Doppelbindung und das Vorhandensein einer 3-Hydroxylgruppe erzeugen zwei asymmetrische Zentren (C2, C3). In der Natur findet man nur 2R-Flavanole [9].

Catechine sind farblos und für ihre adstringierende Wirkung bekannt. Sie sind vor allem in grünem Tee, Rotwein und dunkler Schokolade enthalten.

2.1.1.5 Anthocyane

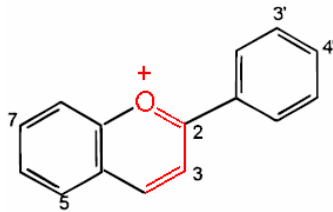


Abbildung 6: Grundstruktur der Anthocyane

Substanz	Position				
	3	5	7	3'	4'
Cyanidin	OH	OH	OH	OH	OH
Cyanin	O-Glc	OH	OH	OH	OH
Pelargonidin	OH	OH	OH		OH

Die, im Gegensatz zu allen anderen Flavonoidklassen, geladenen Anthocyane findet man als rote, blaue und violette Farbpigmente in Blüten, Früchten, Rhabarber, Auberginen, Rotkraut und Radieschen. Der Anthocyangehalt von Früchten steigt normalerweise bei der Reifung. Sie befinden sich bei den Früchten, außer bei den Beeren, nur in der Schale. Die unterschiedlichen Farbschattierungen entstehen durch Metallkomplexe mit Eisen und Magnesium.

Anthocyane sind auch zugelassene Lebensmittelfarbstoffe, deren Farbe teilweise pH-Wert abhängig ist. Sie ist normalerweise rot bei pH 3,5 und verschiebt sich in Richtung blau mit steigendem pH [12].

2.1.1.6 Isoflavone

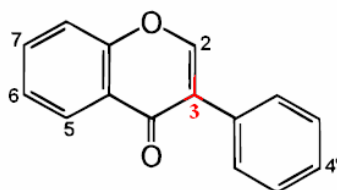


Abbildung 7: Grundstruktur der Isoflavone

Substanz	Position			
	5	6	7	4'
Genistein	OH		OH	OH
Genistin	OH		O-Glc	OH
Daidzein			OH	OH
Biochanin A	OH		OH	OCH ₃
Formononetin			OH	OCH ₃
Glycitein		OCH ₃	OH	OH
Glycitin		OCH ₃	O-Glc	OH

Die Isoflavone unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Bindungsstelle des B-Rings von den anderen Flavonoidklassen. Die bekanntesten Vertreter sind Genistein und Daidzein. Man findet sie hauptsächlich in Leguminosen, vor allem in Sojabohnen, aber auch in grünen, schwarzen und Limabohnen, Kicher-

und Spalterbsen, Alfafasprossen, Kleesprossen und Sonnenblumenkernen. Isoflavone sind bekannt für ihre östrogene Wirkung [12].

2.1.2 Funktion der Flavonoide in Pflanzen

Keiner anderen Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen werden so viele und so unterschiedliche Schlüsselfunktionen beim Wachstum und bei der Entwicklung von Pflanzen nachgesagt wie den Flavonoiden. Viele dieser Funktionen sind wichtig für das Überleben der Pflanzen. Grundsätzlich muss man zwischen den Funktionen der roten und blauen Anthocyane und denen des farblosen oder gelben Rests unterscheiden [13].

2.1.2.1 Funktionen der Anthocyane

Es gibt experimentelle Hinweise darauf, dass Anthocyane der Abwehr dienen und die Pflanze vor herbivoren oder pathogenen Angriffen schützen, aber keine Beweise. Sie sind für einige wirbellose Tiere toxisch, außerdem fressen viele Insekten keine rotblättrigen Pflanzen. Das kann einerseits daran liegen, dass rotes Laub wie junge Blätter aussieht, die wenig Stickstoff und Mineralien enthalten, andererseits sieht man die Insekten auf den roten Blättern gut und sie werden leichter von Feinden entdeckt. Anthocyane und Chlorophyll ergeben zusammen eine schwarzbraune Farbe, dadurch sehen die Blätter wie totes Laub aus und sind zusätzlich nur schwer vom Boden unterscheidbar.

Die meisten Anthocyane absorbieren Licht zwischen 270 und 290 nm, acetylierte Anthocyane sind besonders gute UV-Absorber. Daher schützen sie pflanzliche DNA, Proteine und Membrane vor Schäden durch die UV-Strahlung der Sonne.

Wenn Pflanzen mehr Lichtenergie bekommen, als sie für die Photosynthese benötigen, entstehen im Gewebe reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Anthocyane könnten die entstehenden Schäden eindämmen. Dafür sind sie allerdings nicht an den geeigneten Stellen im Gewebe platziert.

In vitro sind Anthocyane sehr starke Antioxidantien. Sie tragen in den Zellen zur Kontrolle der ROS-Mengen bei und könnten als Reaktion auf oxidativen Stress

oder das Wachsen unter widrigen Umweltbedingungen gebildet werden. Sie sind aber auch für diese Funktion nicht in den passenden Geweben lokalisiert.

Am wahrscheinlichsten ist Anthocyanbildung eine allgemeine Reaktion auf Stress. So können Verletzungen, Pathogene, Temperaturextreme, starkes Licht, UV-Strahlung, Nährstoffmangel, Trockenheit und vieles mehr einen Anstieg der Anthocyanmengen in Pflanzen verursachen [13].

2.1.2.2 Funktionen der farblosen und gelben Flavonoide

Die farblosen und gelben Flavonoide dienen den Pflanzen ebenfalls als Schutz vor Stress. Durch UV-Strahlung, Verletzungen, extreme Temperaturen, Ozon, starke Beleuchtung, Pathogene oder Nährstoffmangel wird ihre Produktion induziert.

Es wird angenommen, dass Flavonoide hauptsächlich beim UV-Schutz eine Rolle spielen. Pflanzen reagieren auf Licht oft mit Flavonoidsynthese. Flavone und Flavonole sind stark UV-absorbierend und reichern sich nach UV-Induzierung hauptsächlich in den Epidermiszellen an, daher könnten sie als Schutz für das photosynthetische Gewebe dienen. Auch in Früchten werden Flavonoide als UV-Schutz produziert, so werden sie in Äpfeln bei starker Sonneneinstrahlung angereichert. Aber nicht alle Flavonoide scheinen gleich gut vor UV-Schäden zu schützen und auch wie sie das tun, ist unklar.

Extreme Temperaturen treiben die Bildung von farblosen Flavonoiden voran. Temperaturstress hemmt Prozesse, die an der Fortpflanzung beteiligt sind. Flavonoide dämpfen diese Effekte ein.

Es gibt Hinweise darauf, dass Flavonoide die Resistenz gegen hohe Schwermetallkonzentrationen im Boden verbessern. Sie können Metalle binden, aber das ist in saurer Umgebung schwierig.

Die antioxidative Wirkung ist allen phenolischen Verbindungen in Pflanzen gemeinsam und man nimmt an, dass Flavonoide eine Schlüsselrolle bei der Bekämpfung von oxidativem Stress haben.

Flavonoide sind auch an der Pflanzenreproduktion beteiligt, sei es durch den Schutz von reproduktivem Gewebe oder von Samen, oder als stimulierender Faktor bei der Samenentwicklung.

Weiters dienen sie als Lockmittel in der Bestäubung und Samenverbreitung. Dabei stellen Anthocyane bei von Insekten bestäubten Pflanzen den offensichtlichen Anteil in den großen und auffällig gefärbten Blütenblättern dar, aber auch Chalcone, Aurone und einige Flavonole färben manche Blüten gelb. Viele Flavone und Flavonole bewirken als Co-Pigmente eine Intensivierung der Farbe. Blütenblätter und andere Pflanzenteile zeigen unter UV-Licht ein komplexes Muster, die auf Flavonolglykoside und Chalcone zurückzuführen sind. Diese Muster bestimmen, welche Tiere zur Bestäubung angelockt werden. Flavonoide in Früchten ziehen möglicherweise Fruchtfresser an, die bei der Samenverbreitung helfen.

Anthocyane, Flavonole und Chalcone reichern sich oft in den männlichen und weiblichen Sexualorganen einer Blume, auch in den Pollenkörnern, an. Dadurch heben sich die Pollen für die UV-wahrnehmenden Insekten von den Blütenblättern ab. Man findet Flavonoide aber auch in Pollen von windbestäubten Pflanzen, daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie an der Pollenkeimung beteiligt sind oder als Wachstumsregulator bei der Bildung des Pollenschlauchs dienen. Da die Befruchtung aber auch bei flavonoidarmen Mutanten funktioniert, wurde eine neue Hypothese aufgestellt, die besagt, dass die Flavonoide das haploide Genom vor mutagenen Auswirkungen von UV-Licht oder oxidativem Stress schützen.

Ein anderer Ansatz sieht die Synthese von Flavonen, Flavonolen und Flavononen als chemische Botenstoffe, z.B. als Verteidigungsmoleküle oder als regulierende Signale.

Isoflavone sind sehr toxisch für Pilzpathogene. Sie verhindern die Keimung der Sporen und das Wachstum des Keimschlauchs und der Hyphen von Pilzen.

Der Nährstoffstatus einer Pflanze hat auch Einfluss auf die Flavonoidmengen im Gewebe. So werden sie z.B. bei Nitratmangel angereichert und dienen als Lockmittel für stickstoffbindende Bakterien. Nur wenige Pflanzenarten können diese knötchenbildenden Bakterien binden, 80% gehen eine Symbiose mit Mykorrhizapilzen ein. Bei dieser Symbiose stellen die Flavonoide keine essentiellen Signalmoleküle dar, viele Phenolsäuren können dasselbe bewirken, aber sie unterstützen die Pollenkeimung (vor allem Kämpferol, Quercetin und Myricetin) und stimulieren so das Pilzwachstum.

Bestimmte Flavonoide werden von den Pflanzen als Schutz vor der Invasion von Parasiten eingesetzt. So produzieren z.B. Pappeln eine chemische Barriere

gegen Misteln. Resistente Bäume enthalten signifikant höhere Flavonol- und Flavonmengen.

Abschließend sei noch die insektizide Wirkung von Flavonoiden erwähnt, sei es als Verdauungsinhibitoren oder durch direkte Toxizität. Dabei sind Isoflavone, Anthocyane, Flavone, Flavonole oder Proanthocyanine involviert [13].

2.1.3 Flavonoide und Gesundheit

Es wurde berichtet, dass Flavonoide viele positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben, wie z.B. antikanzerogene, entzündungshemmende, immunmodulierende, antiallergene, antivirale und antibakterielle. Des Weiteren verhindern sie die Oxidation von Low Density Lipoproteins (LDL), die Aggregation von Blutplättchen und die Aktivität von Enzymen. Sie lösen diese Effekte als Antioxidantien, Radikalfänger, Chelatbildner mit Metallionen und durch Wechselwirkungen mit Enzymen aus [3].

Flavonoide erregten vermehrt die Aufmerksamkeit der Wissenschaft durch das „französische Paradoxon“: Trotz fettreichen Essens und eines hohen Raucheranteils in der Bevölkerung treten in Südfrankreich seltener Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf, die normalerweise mit diesem ungesunden Lebensstil in Verbindung gebracht werden. Die Erklärung fand man im höheren Konsum von Rotwein und den in ihm enthaltenen Polyphenolen [7, 14].

Trotz der zahlreichen Untersuchungen, die seither durchgeführt wurden, weiß man nur wenig über die Aufnahme und Verstoffwechslung der Flavonoide. Auch die täglich aufgenommene Menge ist nicht genau bekannt.

2.1.3.1 Flavonoide als Antioxidantien, Radikalfänger und Chelatbildner

Bei reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies handelt es sich um freie Radikale, wie Superoxid-, Peroxyl-, Alkoxyl-, Hydroxyl- und Stickoxidradikale und nichtradikale Verbindungen, wie Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. ROS spielen eine wichtige Rolle bei der Energieproduktion in der Atmungskette. Wenn sie jedoch im Übermaß produziert werden, greifen sie Lipide, Proteine, Enzyme und die DNA an. Der menschliche Organismus hat Systeme zum Schutz vor freien Radikalen

entwickelt, wie die Enzyme Glutathionperoxidase, Katalase und Superoxid-Dismutase oder andere Verbindungen, wie z.B. Glutathion, Histidin-Peptide, Transferrin und Ferritin u.v.m. Schaffen es ROS trotzdem, Schäden zu verursachen, gibt es im Körper Reparaturmechanismen zur Behebung [6]. Sind die körpereigenen Schutz- und Reparatursysteme beeinträchtigt oder versagen sie, können durch die Nahrung aufgenommene Antioxidantien Schädigungen verhindern. Unter diesen Substanzen sind die Flavonoide die am besten untersuchte Gruppe.

Mögliche antioxidative Mechanismen sind:

- Unterdrückung der Bildung von ROS, entweder durch Enzymhemmung oder durch Chelatbildung mit Spurenelementen, die an der Bildung von freien Radikalen beteiligt sind
- Einfang der ROS
- Hochregulierung der körpereigenen Schutzmechanismen [6]

Die Flavonoide unterscheiden sich teilweise stark in ihrer Aktivität als Antioxidantien und ihre Wirkung wird bestimmt durch:

- das Redoxpotential und damit ihrer Reaktivität als Wasserstoff- oder Elektronendonator
- die Möglichkeit des Antioxidantenradikals, das ungepaarte Elektron zu delokalisieren und stabilisieren
- ihre Reaktivität mit anderen Antioxidantien
- die Fähigkeit mit Übergangsmetallen Komplexe zu bilden

Polyphenole sind *in vitro* effektivere Antioxidantien als die Vitamine C und E. Ihre Neigung zur Chelatbildung mit zweiwertigen Metallionen, speziell mit Eisen und Kupfer, unterstützt die Rolle von Polyphenolen als präventive Antioxidantien, da sie die metallkatalysierte Bildung freier Radikale hemmen [8].

Zu den Struktureigenschaften, die die oben angeführten Bedingungen erfüllen und so eine starke antioxidative Wirksamkeit ermöglichen, zählen:

- *ortho*-3',4'-Dihydroxyrest (Catecholgruppe) am B-Ring (bei z.B. Catechin, Luteolin, Quercetin)
- *meta*-5,7-Dihydroxyanordnung am A-Ring (bei z.B. Kämpferol, Apigenin, Chrysin)
- 2,3-Doppelbindung gemeinsam mit einer 4-Ketogruppe am C-Ring zur Delokalisierung von ungepaarten Elektronen (bei z.B. Quercetin); eine 3-Hydroxylgruppe verstärkt die Wirkung.

- Zwei Angriffspunkte für die Chelatbildung mit Übergangsmetallionen sind bekannt: o-Diphenolgruppen an den 3',4'-Positionen am B-Ring und die Ketostrukturen 4-Oxo- und 3-Hydroxy- oder 4-Oxo- und 5-Hydroxyl- am Ring C

Glykosylierung setzt die antioxidative Aktivität herab [6, 8].

Flavonoide hemmen die Enzyme, die für die Bildung von Superoxid und anderen ROS verantwortlich sind. Sie bilden Chelate mit Metallionen, die eine wichtige Rolle im Sauerstoffmetabolismus spielen. Diese Ionen sind aber auch für viele physiologische Funktionen wichtig, z.B. als Cofaktoren oder Bestandteile von Hämproteinen [6].

2.1.3.2 Flavonoide und Krebs

Eine antikanzerogene Wirkung von Flavonoiden wurde in *in vitro*-Studien und Tierversuchen beobachtet, allerdings wurden bei diesen Studien Konzentrationen eingesetzt, die niemals über die Nahrung aufgenommen werden können. In epidemiologischen Untersuchungen konnte nur ein Rückgang des Lungenkrebsrisikos festgestellt werden [10].

Flavonoide wirken *in vitro* in allen drei Phasen der Kanzerogenese. Dabei sind mehrere Mechanismen möglich. Flavonoide hemmen Phase-I- und Phase-II-Enzyme. Ihre Struktur ist den Nukleotiden ähnlich, daher können sie sich an die DNA anlagern, ohne sie zu schädigen und so die Bindung von Kanzerogenen verhindern. Sie hemmen das unkontrollierte Wachstum der Tumorzellen und leiten die Apoptose ein. Als Antioxidantien und Radikalfänger verhindern sie, dass ROS die DNA schädigen können. Sie beeinflussen das Immunsystem. *In vitro* wurde ihre immunsuppressive Wirkung nachgewiesen, die aber auch die Tumorbildung fördern könnte [10].

Ein vermehrter Isoflavonkonsum verringert das Risiko, an Krebsarten zu erkranken, die mit Östrogen in Verbindung gebracht werden [7]. Genistein blockiert einen bestimmten Transkriptionsfaktor, was dazu führt, dass Krebszellen verhungern und absterben [14].

2.1.3.3 Flavonoide und Herz-Kreislauf -Erkrankungen

In der Zutphen Elderly Study konnte ein Zusammenhang zwischen der Flavonoidzufuhr und dem verringerten Risiko an Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erkranken, festgestellt werden [3].

Ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wird mit der Oxidation von LDL in Verbindung gebracht. Oxidiertes LDL wird von Makrophagen aufgenommen, die daraus Schaumzellen bilden. Diese Schaumzellen sind ein früher Hinweis auf artherosklerotische Läsionen [8].

Eine weitere Möglichkeit der Flavonoide das Herz-Kreislauf-Risiko zu senken, ist die Verhinderung der Thrombozytenaggregation, indem sie in den Arachidonsäure-Stoffwechsel eingreifen [10].

2.1.3.4 Entzündungshemmende Wirkung von Flavonoiden

Flavonoide haben Auswirkungen auf verschiedene Faktoren einer Entzündung. So beeinflussen sie das Cyclooxygenase-System und den 5-Lipoxygenase-Stoffwechselweg des Arachidonsäure-Stoffwechsels und setzen so die Prostaglandinbildung herab. Hesperetin kann eine entzündungsbedingte Schwellung verkleinern. Mit Apigenin wurde *in vitro* eine Hemmung des Fibroblastenwachstums beobachtet. Fibroblasten sind wichtig für die Bildung von Narbengewebe, eine zu geringe oder zu starke Aktivität der Fibroblasten hat eine verzögerte Wundheilung zur Folge [10, 14].

2.1.3.5 Präbiotische Wirkung von Flavonoiden

Einige Studien zeigen, dass regelmäßiger Konsum von Grüntee-Polyphenolen die Zusammensetzung der Darmflora von Menschen, Schweinen und Schafen beeinflusst, so wird z.B. der pH-Wert gesenkt, das Wachstum von *Clostridium perfringens* unterdrückt und der Anteil der Bifidobakterien erhöht [7].

2.1.3.6 Antivirale Wirkung von Flavonoiden

Da Flavonoide virale Proteine binden können und auch in die Nukleotidsynthese eingreifen, könnten sie den durch Viren verursachten Krankheiten entgegenwirken. Für Quercetin wurde im Tierversuch mit Mäusen ein schwacher Schutz vor Tollwutviren beobachtet [10]. In China wird in der traditionellen Medizin *Artemisia annua* zur Behandlung von Malaria eingesetzt, deren Wirkung den enthaltenen Flavonoiden Casticin und Artemitin zugeschrieben wird [14].

2.1.3.7 Krampflösende Wirkung von Flavonoiden

Es ist bekannt, dass Flavonoide durch das Entspannen von glatter Muskulatur in verschiedensten Teilen des Körpers krampflösend wirken [14].

2.1.3.8 Östrogene Wirkung von Flavonoiden

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Hormonen können einige Flavonoide an Östrogenrezeptoren binden. Eine östrogene Wirkung wird vor allem den Isoflavonen zugeschrieben, aber es gibt auch andere Flavonoide, wie 8-Isopentenylnaringenin, die diese Wirkung auch und teilweise sogar noch stärker zeigen [14].

2.1.3.9 Einfluss von Flavonoiden auf das Immunsystem

Die in *in vitro*-Versuchen und *in vivo*-Studien beobachtete Modulation des Immunsystems, meistens eine Unterdrückung, könnte mit folgenden Mechanismen zusammenhängen: der Hemmung des Wachstums von Lymphozyten, der Freisetzung von natürlichen Killerzellen und/oder Histamin, der Beeinträchtigung von Makrophagen oder der Herabsetzung der Interleukin-2-Abgabe [10].

2.1.3.10 Negative Effekte

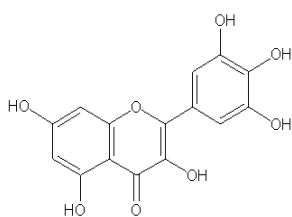
Die immunmodulierende Wirkung der Flavonoide könnte sich auch negativ auf die Gesundheit auswirken, indem sie die Tumorbildung fördert, das ist aber *in vivo* nicht nachgewiesen worden [10].

Toxische Effekte wurden bei Tierversuchen bei Dosen von 1-1,5 g pro Tag beobachtet. Die Aufnahme von toxischen Mengen über Nahrungsmittel ist sehr unwahrscheinlich [3].

Bei Einnahme von Medikamenten kann es zu unerwünschten Wechselwirkungen mit Flavonoiden kommen. Einige verändern die Pharmakokinetik, indem sie Cytochrom P450 und CYP1A2 hemmen [15].

2.1.4 Beschreibung der verwendeten Flavonoide

2.1.4.1 Myricetin



Summenformel: $C_{15}H_{10}O_8$

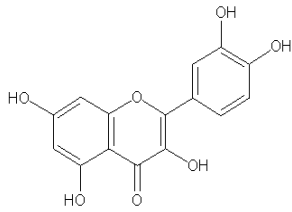
Molekulargewicht: 318,24 g/mol

Synonyme: 3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavon;
Cannabiscetin;

Abbildung 8: Strukturformel von Myricetin

Das Flavonol Myricetin ist neben Quercetin und Rutin eines der stärksten Antioxidantien in der Flavonoidfamilie. Im Tierversuch zeigt es eine Insulin-analoge Wirkung. Außerdem könnte es Allergien und Entzündungen positiv beeinflussen. Man findet Myricetin in schwarzen Johannisbeeren, Trauben, Walnüssen und schwarzem Tee [16].

2.1.4.2 Quercetin



Summenformel: $C_{15}H_{10}O_7$

Molekulargewicht: 302,24 g/mol

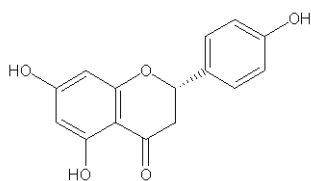
Synonyme: 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon

Sophoretin; Meletin; Xanthaurin; Quercetol; Cyanidanol;

Abbildung 9: Strukturformel von Quercetin

Das gelbe Flavonol Quercetin und seine Glykoside sind die am häufigsten vorkommenden Flavonoide und weit verbreitet in pflanzlichen Lebensmitteln. Die höchsten Konzentrationen findet man in Zwiebeln, Grünkohl, grünen Bohnen, Äpfeln, Kirschen, Brokkoli und Karfiol. Da Quercetin leicht verfügbar ist, ist es auch das am besten untersuchte Polyphenol. In unzähligen *in vitro*-Studien wurden positive Auswirkungen auf verschiedene Krankheiten beobachtet. Doch in diesen Untersuchungen wurden sehr hohe Dosen verwendet und ein Beleg für diese Effekte *in vivo* fehlt. Trotzdem wird Quercetin als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben [17].

2.1.4.3 Naringenin



Summenformel: $C_{15}H_{12}O_5$

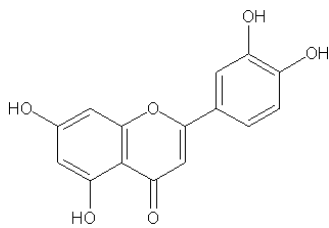
Molekulargewicht: 272,26 g/mol

Synonyme: 4',5,7-Trihydroxyflavanon;

Abbildung 10: Strukturformel von Naringenin

Das farblose und fettlösliche Flavanon Naringenin hat eine hohe Bioverfügbarkeit und man findet es vorwiegend in Zitrusfrüchten. Sein Glykosid Naringin ist ein Bitterstoff in der Grapefruit. Eine Behandlung von Hepatitis-C-infizierten Leberzellen mit dem Aglykon Naringenin führte *in vitro* zu einer Reduktion der Virusmenge [15].

2.1.4.4 Luteolin



Summenformel: $C_{15}H_{10}O_6$

Molekulargewicht: 286,24 g/mol

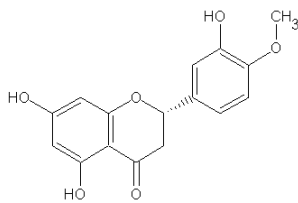
Synonyme: 3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon

Digitoflavon; Flacitran; Luteolol;

Abbildung 11: Strukturformel von Luteolin

Das gelbe Flavon Luteolin findet man in Sellerie, Salbei, Thymian, Kleeblüten, Kamille und grünem Paprika.

2.1.4.5 Hesperetin



Summenformel: $C_{16}H_{14}O_6$

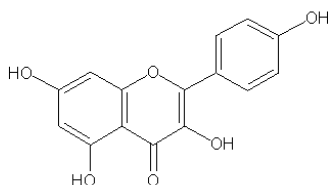
Molekulargewicht: 302,28 g/mol

Synonyme: 3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxy flavanon

Abbildung 12: Strukturformel von Hesperetin

Das farblose Flavanon Hesperetin findet man in Zitrusfrüchten und daraus hergestellten Lebensmitteln.

2.1.4.6 Kämpferol



Summenformel: $C_{15}H_{10}O_6$

Molekulargewicht: 286,24 g/mol

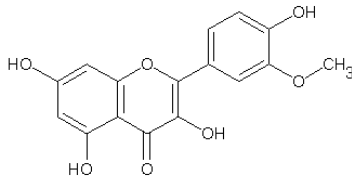
Synonyme: 3,4',5,7-Tetrahydroxyflavon

Pelargidenolon; Rhamnolutin; Trifolitin; Robigenin;

Abbildung 13: Strukturformel von Kämpferol

Das gelbe Flavonol kommt in vielen pflanzlichen Lebensmitteln vor, in Äpfeln, Zwiebeln, Trauben, Lauch, Kohlsprossen und Brokkoli in besonders hohen Konzentrationen.

2.1.4.7 Isorhamnetin



Summenformel: C₁₆H₁₂O₇

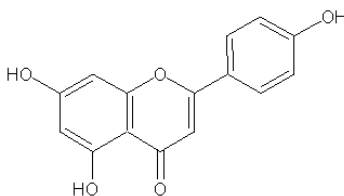
Molekulargewicht: 316,27 g/mol

Synonyme: 3,4',5,7-Tetrahydroxy-3'-methoxyflavon
3-Methylquercetin; Isorhamnetol; Tamarixetin;

Abbildung 14: Strukturformel von Isorhamnetin

Das intensiv gelbe Flavonol Isorhamnetin kommt natürlich in Pflanzen vor, kann aber auch bei der Metabolisierung von Quercetin, durch Methylierung, entstehen. Man findet es in *Ginko biloba*, roten Rüben, Goldrute und Senfblättern [18].

2.1.4.8 Apigenin



Summenformel: C₁₅H₁₀O₅

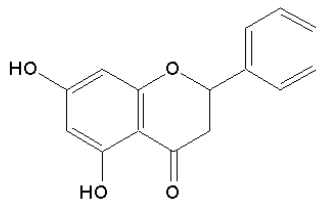
Molekulargewicht: 270,24 g/mol

Synonyme: 4',5,7-Trihydroxyflavon
Apigenol; Versulin;

Abbildung 15: Strukturformel von Apigenin

Man findet das gelbe Flavon in Petersilie, Sellerie, Kamille, Rosmarin und Wegerich.

2.1.4.9 Pinocembrin



Summenformel: $C_{15}H_{12}O_4$

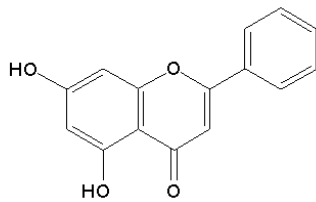
Molekulargewicht: 256,26 g/mol

Synonyme: 5,7-Dihydroxyflavanon

Abbildung 16: Strukturformel von Pinocembrin

Bei Pinocembrin handelt es sich um ein Flavanon mit unsubstituiertem B-Ring. Man findet es in Süßholz und Propolis.

2.1.4.10 Chrysin



Summenformel: $C_{15}H_{10}O_4$

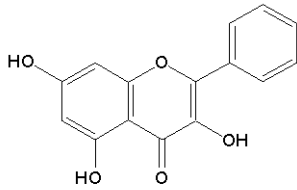
Molekulargewicht: 254,24 g/mol

Synonyme: 5,7-Dihydroxyflavon

Abbildung 17: Strukturformel von Chrysin

Das hellgelbe Flavon Chrysin kommt in Schalen von Früchten und in *Passiflora caerulea* vor. Es wird von Bodybuildern zur Steigerung des Testosteronlevels eingesetzt, es gibt *in vivo* aber keine Beweise dafür. Bei einem Tierversuch mit Nagern wirkte Chrysin gegen Angstzustände [19].

2.1.4.11 Galangin



Summenformel: $C_{15}H_{10}O_5$

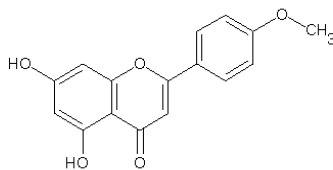
Molekulargewicht: 270,24 g/mol

Synonyme: 3,5,7-Trihydroxyflavon; Norizalpinin

Abbildung 18: Strukturformel von Galangin

Das intensivgelbe Flavonol Galangin findet man vor allem in der Galgantwurzel.

2.1.4.12 Acacetin



Summenformel: $C_{16}H_{12}O_5$

Molekulargewicht: 284,27 g/mol

Synonyme: Linarigenin; Linarisenin; Akatsetin
4'-Methoxyapigenin

Abbildung 19: Strukturformel von Acacetin

Das hellgelbe Flavon Acacetin kommt in Chrysanthemen, Rossminze, Beifuß und Leinkraut vor.

3 HONIG

3.1 Entstehung, Gewinnung und Verarbeitung

In der Richtlinie 2001/110/EG des Rates der Europäischen Union [2] ist Honig definiert als:

„der natursüße Stoff, der von Bienen der Art *Apis mellifera* erzeugt wird, indem die Bienen Nektar von Pflanzen oder Absonderungen lebender Pflanzenteile oder sich auf den lebenden Pflanzenteilen befindliche Sekrete von an Pflanzen saugenden Insekten aufnehmen, durch Kombination mit eigenen spezifischen Stoffen umwandeln, einlagern, dehydrieren und in den Waben des Bienenstockes speichern und reifen lassen.“

Um Nektar oder Honigtau für 150 g Honig zu sammeln, müssen die Bienen etwa 40.000 km fliegen. Die süßen Säfte werden in der Honigblase gesammelt und im Bienenstock an die Stockbienen weitergegeben. Diese pumpen ihn aus und saugen ihn mehrmals wieder an, dabei wird er mit Enzymen angereichert und der Wassergehalt sinkt. Danach wird er in den Waben abgelagert. Durch das Schlagen der Flügel im 30-35°C warmen Stock verdampft noch mehr Wasser. Die gefüllten Waben werden mit Wachs verschlossen. Bei der drei bis vier Wochen dauernden Reifung wird die Saccharose durch Ansäuern und Enzyme invertiert und Aromastoffe entstehen. Gereiften Honig erkennt man an den eingefallenen Wachsdeckeln [2, 5, 20-22].

Der Honig kann aus den Waben durch verschiedene Verfahren gewonnen werden, die im Kapitel 3.3.1 näher erläutert werden.

Man darf dem Honig, der in den Handel kommt, keine Lebensmittelzusatzstoffe oder andere Substanzen beimengen. Er darf keinen fremdartigen Geschmack oder Geruch haben, nichts Verdorbenes enthalten und nicht zu fermentieren oder zu schäumen begonnen haben. Typische Honiginhaltsstoffe, wie z.B. Pollen, dürfen nicht entfernt werden, außer es lässt sich bei der Entfernung von Fremdstoffen nicht vermeiden. Starkes Erhitzen oder Verarbeiten ist zu vermeiden, da sonst seine Qualität beeinträchtigt wird [1, 2, 23].

Die meisten Honigsorten werden bei längerer Lagerung mit der Zeit dickflüssig bis fest. Um dies zu verhindern, können Kristallisationskeime, wie z.B. Zuckerkristalle durch Druckfiltration entfernt werden, dabei geht aber auch ein großer Teil der Blütenpollen verloren. Zur Abfüllung, Verarbeitung oder Pasteurisation kann der Honig erhitzt werden, dabei muss die Temperatur aber genau kontrolliert werden, da der Honig aufgrund seines pH-Wertes und der hohen Fructosekonzentration überaus empfindlich auf zu hohe Temperaturen reagiert.

Honig sollte unter 10°C und wasserdicht gelagert werden. Während der Lagerung verliert er an Geruch und Geschmack, er dunkelt nach und sein Hydroxymethylfurfural-Gehalt nimmt zu [5]. Er sollte nicht in Metallgefäßen aufbewahrt werden, da die Säuren des Honigs eine Oxidation der Gefäßoberfläche bewirken können [24].

Neben den *Apis mellifera*-Honigen werden auch Honige von anderen Bienenarten verkauft. So ist z.B. die Art *Apis cerana* in Asien und die stachellose Biene (*Apis dorsata*, *Melipona* spp., *Scaptotrigona* spp., *Trigona* spp.) vor allem in Südamerika, aber auch in Australien, Asien und Afrika verbreitet [23, 25-28]. Die EU-Richtlinie definiert Honig als von *Apis mellifera* stammend, für Honige mit anderem entomologischen Ursprung sind keine Qualitätskriterien festgelegt worden.

In Österreich wurden 2006 über 1 kg Honig pro Person und Jahr verzehrt [22], weltweit wurden 2005 fast 1,4 Millionen Tonnen produziert [29].

3.2 Zusammensetzung

Honig ist eine wässrige Zuckerlösung, die neben Invertzucker noch viele andere Substanzen, wie Enzyme, organische Säuren und Blütenpollen enthält. Die Inhaltsstoffe stammen entweder von der Biene oder der Pflanze oder entstehen bei der Reifung. Die in Tabelle 1 übersichtlich dargestellte Zusammensetzung variiert je nach Klima, geographischem oder pflanzlichem Ursprung.

Tabelle 1: Honigzusammensetzung [5]

Bestandteil	Mittelwert (%)	Schwankungsbreite (%)
Wasser	17,2	13,4 – 22,9
Fructose	38,2	27,3 – 44,3
Glucose	31,3	22,0 – 40,8
Saccharose	2,4	1,7 – 3,0
Maltose	7,3	2,7 – 16,0
höhere Zucker	1,5	0,1 – 8,5
Sonstiges	3,1	0 – 13,2
Stickstoff	0,06	0,05 – 0,08
Mineralstoffe	0,22	0,2 – 0,4
	(mval/kg)	(mval/kg)
freie Säure	22	6,8 – 47,2
Lactone	7,1	0 – 18,8
Gesamtsäure	29,1	8,7 – 59,5
pH-Wert	3,9	3,4 – 6,1
Diastasezahl	20,8	2,1 – 61,2

3.2.1 Kohlenhydrate

Zucker machen etwa 80% des Honigs aus. Die einzigen Monosaccharide, die man in Honig findet, sind Fructose und Glucose, daneben wurden über 20 verschiedene Oligosaccharide gefunden, deren Mengenanteile hauptsächlich von dem Pflanzenursprung des Honigs abhängen. Die Saccharosemenge ist stark vom Reifegrad abhängig [5].

3.2.2 Wasser

Der Wassergehalt ist wichtig für die Haltbarkeit des Honigs, da sich bei zu hohem Gehalt (> 20%) Hefen leicht vermehren können, die den Honig vergären. Unter 17,1% besteht keine Gefahr, dazwischen hängt die Haltbarkeit von der Keimzahl der Hefen ab [5]. Wird der Honig zu früh geerntet, enthält er zuviel Wasser und kann gärig oder sauer werden.

3.2.3 Enzyme

Im Honig findet man α -Glucosidasen (Invertase, Saccharase), wobei man mit Hilfe der Aktivität der Invertase thermische Behandlung des Honigs nachweisen kann, da diese dabei inaktiviert wird. Die nachgewiesenen α - und β -Amylasen (z.B. Diastase) gelangen durch die Biene in den Honig, wobei mittels Diastaseaktivität die Behandlung des Honigs mit hohen Temperaturen nachgewiesen werden kann. Die im Honig vorhandene Glucoseoxidase oxidiert Glucose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid. Katalase und saure Phosphatase kommen wahrscheinlich über die Pollen in den Honig [5]. Die Enzymmenge im Honig unterliegt natürlichen Schwankungen und hängt auch damit zusammen, wie die Bienen den Honig verarbeiten.

3.2.4 Aminosäuren und Proteine

Die Proteine, die man in Honig findet, stammen sowohl von der Biene, als auch von der Pflanze. Honig vom Heidekraut hat den höchsten Proteingehalt.

Das Muster der freien Aminosäuren ist von der geographischen Herkunft des Honigs abhängig. Prolin, das wahrscheinlich durch die Biene in den Honig gelangt, dominiert die Aminosäurenfraktion [5].

3.2.5 Säuren

Der Großteil der organischen Säuren entsteht in den Speicheldrüsen der Honigbienen. In geringen Konzentrationen kommen z.B. Essig-, Milch-, Butter-, Zitronen-, Apfel-, Ameisen- und Oxalsäure vor. Den Hauptanteil (etwa 75%) macht aber die Gluconsäure aus, die von der Glucoseoxidase erzeugt wird. Trotz des höheren Säureanteils liegt der pH-Wert von Honigtauhonigen (pH 4 - 5,4) höher als der von Blütenhonigen (pH 3,6 - 4,5), das liegt daran, dass der höhere Mineralstoffgehalt in ersterem die Säuren abpuffert. Unreifer Honig hat einen sehr niedrigen Säuregrad, der beim Reifen durch Milchsäure- und Essiggärung stark ansteigt [5, 30].

3.2.6 Aromastoffe

Bei den flüchtigen Verbindungen im Honig handelt es sich um Ester aliphatischer und aromatischer Säuren, Aldehyde, Ketone und Alkohole. Insgesamt wurden über 300 von ihnen gefunden. β -Damascenon und Phenylacetaldehyd haben einen dem Honig ähnlichen Geruch. Viele andere Aromakomponenten sind für bestimmte Honigarten typisch, wie z.B. Anthranilsäuremethylester für Zitrus- und Lavendelhonige [5]. Die Aromastoffzusammensetzung und die Stärke des Aromas sind vom Ursprung des Honigs abhängig.

3.2.7 Mineralstoffe

Der Mineralstoffgehalt hängt vom Boden ab, in dem die Ursprungspflanze gewachsen ist und ist am niedrigsten in hellen Honigen und am höchsten in dunklen [31].

3.2.8 Fettsäuren

Honig enthält sehr wenig bis kein Fett, ein Charakteristikum des KleeHonigs sind aber die in ihm enthaltenen freien Fettsäuren, vor allem Palmitin-, Öl- und Linolensäure [26].

3.2.9 Vitamine

Die Vitamine im Honig (C, B₆, Nicotinamid, B₁, B₂, K) stammen wahrscheinlich von den Pollen und von Drüsensekreten der Bienen. Die wasserlöslichen B-Vitamine dominieren [30].

3.2.10 Cholin und Acetylcholin

Bienen produzieren Cholin, das mit Essigsäure zu Acetylcholin reagiert. Honig enthält zwischen 0,3 - 25 mg/kg Cholin und 0,6 - 5 mg/kg Acetylcholin [30].

3.2.11 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

HMF entsteht bei pH-Werten unter 5 durch Dehydratisierung von Zuckern, vor allem Fructose, in Gegenwart von Aminosäuren wird die Bildung beschleunigt. Der anfänglich geringe Gehalt in frischem Honig steigt während der Lagerung und durch Erhitzung. Honige aus Gebieten mit tropischem Klima enthalten schon im frischen Zustand höhere HMF-Mengen [30, 32].

3.2.12 Osmophile Hefen

Osmophile Hefen sind Mikroorganismen, die im Honig leben und bei zu hohem Wassergehalt den Honig vergären [30].

3.2.13 Honigsedimente

Unter Honigsedimenten versteht man den wasserunlöslichen Anteil von Honig. Dabei handelt es sich um Algen, Pilzsporen, Wachswolle und Insektenteile [30].

3.2.14 Pollenkörner

Pollen, das sind die männlichen Keimzellen blühender Pflanzen, bleiben beim Aufsammeln des Nektars an der Biene hängen oder werden von speziellen Sammelbienen in den Stock getragen und kommen so in den Honig. Die Menge variiert je nach Honigsorte und liegt im Allgemeinen zwischen 20.000 und 80.000 Körnern/10 g Honig, es wurden aber auch schon bis zu 500.000/10 g gezählt. Mit ihrer Hilfe kann sowohl der botanische, als auch der geographische Ursprung des Honigs bestimmt werden [26, 30, 33].

3.2.15 Propolis

Das Ausgangsmaterial von Propolis wird von den Bienen an den Blattknospen oder von Rissen in der Rinde von Bäumen gesammelt, in Europa vor allem von der Pappel, aber auch von Buchen, Birken, Kastanien und Koniferen. Propolis besteht aus 50% Harz, 30% Wachs, 10% essentiellen Ölen, und je 5% Pollen und verschiedensten organischen Verbindungen. Mit dieser klebrigen Substanz werden Löcher im Stock verklebt, damit er wind- und wetterfest ist und kein Honigräuber eindringen kann. Propolis dient auch der Hygiene im Bienenstock, da von den Bienen getötete Eindringlinge, die zu groß sind, um sie hinauszutransportieren, damit „einbalsamiert“ werden. Zu der Vielzahl an enthaltenen organischen Spurenstoffen gehören auch Flavonoide, von denen Pinobanksin und Pinocembrin die Hauptvertreter sind [33, 34].

3.2.16 Polyphenolische Verbindungen

Die Farbe des Honigs stammt wahrscheinlich von Produkten der Maillard-Reaktion, die aus Aminosäuren und Fructose gebildet werden, und von polyphenolischen Verbindungen [5].

3.2.17 Toxische Honiginhaltsstoffe

Giftige Substanzen im Honig stammen von der Pflanze, wie die Grayanotoxine mancher Rhododendronarten oder Tutin und Hyenanchin vom neuseeländischen Tutu-Strauch. Sie werden mit dem Nektar bzw. dem Honigtau in den Honig gebracht. In Mitteleuropa sind ebenfalls Pflanzen mit giftigen Stoffen in der Blüte heimisch, wie Tollkirsche, Oleander oder Jasmin, die von Bienen bestäubt werden. Diese sind jedoch entweder nicht in den Nektar gelangt, oder man findet sie nur in sehr geringen Mengen im Honig [5].

3.2.18 Unerwünschte Inhaltsstoffe

Zu den unerwünschten Inhaltsstoffen zählen umweltbedingte Verunreinigungen, wie z.B. Mikroorganismen, Pestizide oder Schwermetalle und von der Bienenhaltung stammende Arzneimittel.

3.2.18.1 Mikroorganismen

Durch den geringen Wasseranteil, die hohe Zuckerkonzentration und die hohe Viskosität ist die Gefahr von mikrobiologischen Verunreinigungen nicht sehr groß. Dennoch kommen *Clostridium botulinum*-Sporen natürlich im Honig vor, weshalb er für Kleinkinder unter einem Jahr nicht geeignet ist [24, 26].

3.2.18.2 Bienenarzneimittel

Die von der Milbe *Varroa jacobsoni* verursachte Krankheit Varroatose kann ganze Bienenvölker töten. Die Milben werden mit verschiedenen Substanzen bekämpft, die über das Wachs in den Honig gelangen können. Ein biologisches Mittel, das auch natürlich in manchen Honigsorten vorkommt, ist Thymol, das in Konzentrationen von über 1 mg/kg den Honiggeschmack beeinträchtigt [20, 30, 35].

In Europa ist der Einsatz von Antibiotika nicht erlaubt, aber in Nord-, Zentral- und Südamerika werden Streptomycin, Sulfonamide und andere zur Vorbeugung und Bekämpfung von Faulbrut eingesetzt [30, 35, 36]. In den vom Verein für Konsumenteninformation im Jahr 2006 getesteten 16 Honigproben wurden keine Antibiotikarückstände nachgewiesen [22]. In einer rumänischen Studie aus dem Jahre 2008 wurden dagegen in etwa 15% der Honigproben Antibiotikarückstände gefunden [35].

3.2.18.3 Pestizide

Im Allgemeinen halten sich die Pflanzenschutzmittelrückstände aus der Landwirtschaft in Honig in Grenzen. Bei zu hohen Konzentrationen sterben die Bienen, bevor sie den Stock erreichen, niedrigere Konzentrationen werden hauptsächlich im Wachs gelöst, können aber in den Honig einwandern. Die im Honig nachgewiesenen Pestizide stammen oft aus der Bienenhaltung selbst, wie z.B. Naphthalin und *p*-Dichlorbenzol als Mittel gegen die Wachsmotte [30, 36-38]. Die Verwendung von Organochlor-Pestiziden, wie DDT, ist inzwischen weltweit verboten, da es sich aber um sehr stabile Verbindungen handelt, sind sie noch immer in der Umwelt und somit auch im Honig zu finden. Die EU hat daher einen Grenzwert von 0,01 mg/kg festgelegt [36]. In Spanien sind diese Rückstände in Honig sogar verboten [37], was aber nicht einzuhalten ist. In einer indischen Studie [39] wurde festgestellt, dass Honige der Bienenrassen *Apis cerana* und *A. dorsata* viel weniger Pestizidrückstände aufweisen als die von *A. mellifera*.

3.2.18.4 Schwermetalle

Die Konzentrationen von Cadmium, Blei, Zink, Quecksilber und Eisen in Honig werden regelmäßig überwacht. Die auftretenden Mengen sind abhängig vom Standort der Bienenstöcke und der Umgebung der Pflanzen [30, 36].

3.3 Honigarten

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Honig zu unterscheiden.

3.3.1 Unterscheidung nach der Gewinnungsart

Honig in frisch gebauten, brutfreien und verdeckelten Waben nennt man Scheiben- oder Wabenhonig. Er kommt in ganzen oder zerteilten Waben auf den Markt und man findet ihn häufig in den USA und in Kanada, weniger in Europa.

Bei Honig mit Wabenanteilen oder Wabenstücke in Honig findet man Scheibenhonigstücke mit dabei.

Der Leckhonig wird auch Tropf-, Lauf- oder Senkhonig genannt und fließt ohne weitere Bearbeitung aus zerkleinerten, brutfreien Waben mit einer Ausbeute von 50 bis 70 % heraus. Diese Gewinnungsmethode ist sehr schonend und nur für relativ dünnflüssige Honige möglich.

Der Schleuderhonig wird durch Zentrifugieren der brutfreien Waben in Schleudern erhalten, wobei eine erhöhte Temperatur bis 40°C die Gewinnung erleichtert. Der Großteil der im Handel erhältlichen Honige wird auf diese Art gewonnen.

Erhält man den Honig durch hydraulisches Pressen brutfreier Waben, wobei man die Temperatur bis auf 45°C erhöhen kann, nennt man ihn Presshonig.

Der Seimhonig wird durch leichtes Erwärmen und anschließendes Pressen von brutfreien eingestampften oder nicht eingestampften Waben erhalten.

Der Stampfhonig, den man durch Einstampfen der Waben samt Brut erhält, ist nicht für den menschlichen Verzehr geeignet und wird als Futter für Bienen verwendet.

Honig, aus dem durch Filtern Fremdstoffe, aber auch Pollen entfernt wurden, bezeichnet man als gefilterten Honig [1, 2, 5].

3.3.2 Unterscheidung nach der Pflanzenherkunft

Blüten- oder Nektarhonige haben je nach Ursprungspflanze eine andere Farbe (von weiß, über verschiedene Gelbtöne, bis braun). Sie sind süß und frisch gewonnen meist dickflüssig und kristallisieren mit der Zeit mehr oder weniger aus.

Honigtauhonig entsteht aus pflanzlichen Sekreten und hat eine dunkelbraune Farbe. Er ist oft weniger süß als Blütenhonige und hat ein intensives, würziges Aroma [1, 5].

3.3.3 Unterscheidung nach dem Verwendungszweck

Speisehonig ist direkt für den menschlichen Verzehr geeignet und bestimmt.

Backhonig wurde entweder zu hoch erhitzt, hat ein untypisches Aroma angenommen oder hat zu gären begonnen. Er ist daher nicht direkt für den menschlichen Verzehr geeignet und wird für industrielle Zwecke oder als Lebensmittelzutat verwendet [1, 2, 5].

3.3.4 Unterscheidung nach der Eintragszeit

Bei einer Tracht bis Ende Mai spricht man von Frühhonig, von Juni und Juli von Haupthonig und von August und September von Späthonig [5].

3.4 Honig als Heilmittel

Schon seit Jahrtausenden wird Honig als Heilmittel in der traditionellen Medizin und als Hausmittel eingesetzt. Ihm werden viele positive Effekte nachgesagt, die aber nicht ausreichend mit wissenschaftlichen Studien belegt sind.

Die bakterienhemmende Wirkung wird vor allem dem enthaltenen Wasserstoffperoxid zugeschrieben, aber auch aromatische Säuren, Flavonoide, Lysozym und flüchtige Verbindungen zeigen einen antibakteriellen Effekt. Es konnte eine antibiotische Wirkung gegen *Staphylokokkus aureus* und *Mikrokokkus luteus* nachgewiesen werden, dabei zeichnete sich Manukahonig durch seine sehr hohe bakterienhemmende Wirkung aus [30, 40].

Auf Wunden verhindert Honig Infektionen, trocknet das infizierte Gewebe aus und fördert die Gewebebildung, außerdem wirkt er entzündungshemmend und schmerzlindernd [30, 41, 42]. In einigen Studien konnte eine Wachstumshemmung bei Antibiotika-resistenten Bakterien, wie MRSA, gefunden werden [24, 30].

Zucker unterstützen die Entgiftung durch die Leber. Die Sekretion wird durch Aromastoffe angeregt. Die Oligosaccharide, wie z.B. Isomaltose, Melezitose und Raffinose wirken präbiotisch. Eine Verbesserung von Magen-Darm-Erkrankungen bewirken im Honig enthaltene Saccharide, Aroma- und Bitterstoffe und jeder kennt warme Milch mit Honig als Mittel gegen Halsschmerzen [26, 30, 42].

Die antioxidativen Eigenschaften vom Honig scheinen nicht von einer einzelnen Komponente auszugehen, sondern aus der Summe vieler Substanzen, wie Phenolen, Polyphenolen, Enzymen, organischen Säuren, Flavonoiden uvm. Honig vom Buchweizen hat die stärkste antioxidative Kapazität [26, 43, 44].

Bei Honig in Verbindung mit Karies sind die Meinungen geteilt. Einerseits klebt Honig auf den Zähnen und zeigt in Untersuchungen eine karinogenere Wirkung als Rübenzucker, andererseits sollen Plaque-Bakterien gehemmt und die Säurebildung verringert werden [22, 30].

Honig ist wegen der in ihm enthaltenen Mono- und Disaccharide, die schnell aufgenommen werden können, ein guter Energiespender. Er liefert circa 320 bis 420 kcal/100 g [29].

3.5 Honigcharakterisierung

In der EU-Direktive und der Honigverordnung sind die in Tabelle 2 angeführten Qualitätsparameter festgelegt.

Tabelle 2: Qualitätskriterien [1, 2]

Fructose- und Glucosegehalt (Summe)	
Blütenhonig	mindestens 60 g/100 g
Honigtauhonig, allein oder in Mischung mit Blütenhonig	mindestens 45 g/100 g
Saccharosegehalt	
Im Allgemeinen	höchstens 5 g/100g
Honig von Robinie (<i>Robinia pseudoacacia</i>), Luzerne (<i>Medicago sativa</i>), <i>Banksia menziensis</i> , Süßklee (<i>Hedysarum</i>), Roter Eukalyptus (<i>Eucalyptus camadulensis</i>), <i>Eucryphia lucida</i> und <i>E. milliganii</i> , <i>Citrus</i> spp.	höchstens 10 g/100g
Honig von Lavendel (<i>Lavendula</i> spp.), Borretsch (<i>Borago officinalis</i>)	höchstens 15 g/100g
Wassergehalt	
Im Allgemeinen	höchstens 20%
Honig von Heidekraut (<i>Calluna</i>) und Backhonig im Allgemeinen	höchstens 23%
Backhonig von Heidekraut (<i>Calluna</i>)	höchstens 25%
Gehalt an wasserunlöslichen Stoffen	
Im Allgemeinen	höchstens 0,1 g/100g
Presshonig	höchstens 0,5 g/100g
Elektrische Leitfähigkeit	
Nachstehend nicht aufgeführte Honigarten und Mischungen dieser Honigarten	höchstens 0,8 mS/cm
Honigtauhonig und Kastanienhonig und Mischungen dieser Honigarten mit Ausnahme der nachstehend angeführten	mindestens 0,8 mS/cm
Ausnahmen: Honig von Erdbeerbaum (<i>Arbutus unedo</i>), Glockenheide (<i>Erica</i>), Eukalyptus, Linden (<i>Tilia</i> spp.), Heidekraut (<i>Calluna vulgaris</i>), <i>Leptospermum</i> , Teebaum (<i>Melaleuca</i> spp.)	Keine Angaben
Gehalt an freien Säuren	
Im Allgemeinen	höchstens 50 Milliäquivalente Säure pro kg
Backhonig	höchstens 80 Milliäquivalente Säure pro kg

Tabelle 2 (Fortsetzung): Qualitätskriterien

Diastaseindex (Schade-Skala)	
Im Allgemeinen mit Ausnahme von Backhonig	mindestens 8
Honigarten mit einem geringen natürlichen Enzymgehalt (z.B. Zitrushonig) und einem HMF-Gehalt von höchstens 15 mg/kg	mindestens 3
Hydroxymethylfurfuralgehalt (HMF)	
Im Allgemeinen, mit Ausnahme von Backhonig	höchstens 40 mg/kg
Honig mit angegebenem Ursprung in Regionen mit tropischem Klima und Mischungen solcher Honigarten	höchstens 80 mg/kg

3.5.1 Sortenreinheit: botanischer und geographischer Ursprung

Um sortenreinen Honig zu erhalten, müssen innerhalb des etwa 3 km großen Flugradius der Bienen hauptsächlich die gleichen Pflanzenarten wachsen. Die Bienenstöcke werden oft zu den gewünschten Pflanzen gebracht, z.B. zu einem Akazienwald [21, 22].

Honig hat nie nur einen einzigen botanischen Ursprung. Die Bezeichnung „monofloral“ wird für Honige verwendet, die hauptsächlich von einer Pflanzenart stammen [31].

Die Bestimmung der botanischen und geographischen Herkunft von gefiltertem Honig ist sehr schwierig bis unmöglich, da die Pollen entfernt wurden. Daher ist es in jedem EU-Mitgliedsstaat den Lebensmittelinspektoren erlaubt, Rohmaterialproben zu nehmen [23]

3.5.2 Verfälschung

Da Honig ein begrenzt verfügbares Naturprodukt ist, wird er manchmal durch den Zusatz verschiedener Substanzen „verlängert“. Typische Verfälschungsmethoden wären die Verdünnung mit Wasser oder der Zusatz von Zuckern und Sirupen (wie Maissirup). Das Zufügen von Wasser ist aber eine eher unrealistische Verfälschungsmethode, da dann die Gefahr der Fermentation besteht. Weitere Möglichkeiten zur Täuschung sind das Füttern der Bienen mit Sirupen und

Zuckerwasser, Kunsthonig und falsche Angaben zur botanischen und/oder geographischen Herkunft [23, 31].

Importierter Honig ist in Österreich billiger als heimischer. Die Hauptimportregionen sind Süd- und Mittelamerika und auch Osteuropa [22] und je nach Land werden für bestimmte Honigsorten (in Österreich z.B. Honigtau Honig) höhere Preise bezahlt, was zu falschen Angaben verführen kann [23].

Es kommt vor, dass ein noch nicht vollständig gereifter „grüner“ Honig geerntet wird. Dieser beginnt aufgrund seines hohen Wassergehaltes, oft über 25%, sehr leicht zu gären, was zu einem Fehlgeschmack führt. Außerdem enthält vergärter Honig Glycerol, Butandiol und Ethanol. Um den Wassergehalt zu senken, werden die unreifen Honige getrocknet, dabei gehen allerdings Aromastoffe verloren [23].

3.5.3 Analysenmethoden

3.5.3.1 Physikochemische und mikroskopische Methoden

Die Messung von physikochemischen Parametern, wie Farbe, Dichte, Wassergehalt, pH-Wert, freien Säuren, elektrischer Leitfähigkeit, Enzymaktivität und HMF-Gehalt ermöglicht ein schnelles und billiges Screening von fragwürdigen Honigproben. Die Untersuchung auf unter dem Mikroskop sichtbare Rohruckeranteile kann vor der teuren Isotopenanalyse durchgeführt werden. Eine Untersuchung auf Verderb kann durch Auszählen von Hefen oder durch enzymatische Bestimmung von Butandiol oder Ethanol vorgenommen werden [23].

3.5.3.2 Pollenanalyse

Die Pollenanalyse ist das traditionelle Verfahren zur Bestimmung der botanischen Herkunft einer Honigprobe. Dabei werden die Blütenpollen unter dem Mikroskop identifiziert und gezählt. Die Vorteile dieser Methode sind ein geringer apparativer und zeitlicher Aufwand. Man benötigt aber gut geschultes, erfahrenes Personal und die Analyse kann nicht computergestützt durchgeführt werden.

Verschiedene Pflanzen produzieren unterschiedlich viele Pollen und die Pollenmenge ändert sich auch je nach Saison und nach Geschlecht der Pflanze. In der Honigblase können die Pollen herausgefiltert werden und Bienen sammeln auch Pollen von Pflanzen, von denen sie keinen Nektar mitnehmen. Weiters können Pollen beim Filtern des Honigs entfernt werden oder sie können auch absichtlich zur Verfälschung zugesetzt werden. All das kann Probleme bei der Honigbestimmung mittels Pollenanalyse verursachen. Da die Bienen nicht nur die Pollen einer Pflanzenart sammeln, ist der Pollenanteil je nach Sorte festgelegt.

Die Pollenanalyse kann zur Bestimmung der botanischen Herkunft verwendet werden. Wenn die Pflanzen nur in einem bestimmten Gebiet wachsen, kann auch die geographische Herkunft bestimmt werden [23, 31].

3.5.3.3 Zucker (Kohlenhydrate)

Begrenzte Verfügbarkeit und relativ hohe Preise sind Gründe, warum Honig mit anderen Kohlenhydraten, wie Invertzuckersirup (IS), konventionellem Maissirup (CS) und Maissirup mit hohem Fructosegehalt (HFCS) gestreckt und somit verfälscht wird. Eine Möglichkeit, den Zusatz von IS nachzuweisen, ist eine HMF-Bestimmung. Dieser Test ist nicht eindeutig, da HMF auch auf Grund von Erhitzung und langer Lagerung in Honig vorhanden sein kann.

Saccharide können mit Analysemethoden bestimmt werden, die auf ihren physikalischen Eigenschaften basieren oder mittels chemischer, enzymatischer oder chromatographischer (TLC, GC, IC, HPLC) Methoden.

Zum Nachweis einer Verfälschung wurde die Zuckerzusammensetzung von Honigproben mittels GC-FID [45] untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Maltose/Isomaltose-Verhältnis dafür nicht geeignet ist, der Saccharose- und Erlosegehalt könnte aber sachdienlich sein. Saccharose hat den Nachteil, dass sie bei der Lagerung durch Invertase abgebaut wird.

Honig, IS und HFCS haben jeweils ein bestimmtes Oligosaccharid-Muster. Dieses Muster kann mittels Anionenaustauschchromatographie bestimmt werden, dabei können bei IS- oder CS-Zusatz zum Honig deren typische „fingerprint“-Muster nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Oligosaccharidfraktion mittels HP-Anionenaustauschchromatographie mit amperometrischem Detektor und statistischer

Datenauswertung ist eine viel versprechende Methode für die Bestimmung der botanischen Herkunft von Honigproben [23, 31].

3.5.3.4 Aminosäuren und Proteine

Es wurde vorgeschlagen, die Mengenverhältnisse verschiedener Aminosäuren zur Bestimmung der geographischen Herkunft eines Honigs heranzuziehen. So variiert das Verhältnis von Asparaginsäure/Prolin zu Amiden/Phenylalanin zwar innerhalb der Proben aus einer Quelle, aber die Unterschiede zwischen den Regionen sind viel größer.

Die Analyse von Aminosäure-Mustern mittels GC von Honigproben unterschiedlicher pflanzlicher Herkunft und die anschließende statistische Auswertung zeigte, dass Aminosäuren wie Arginin, Tryptophan und Cystein für manche Honigsorten typisch sind. In manchen Fällen ermöglichte das Gesamt-Aminosäure-Profil die Unterscheidung zwischen verschiedenen Sorten. Es konnte aber keine bestimmte Aminosäure oder Aminosäurengruppe gefunden werden, die zur Charakterisierung einer Honigsorte verwendet werden könnte.

Die Untersuchung von freien Aminosäuren mittels GC und nachfolgender statistischer Bewertung der Ergebnisse zur Charakterisierung des geographischen Ursprungs war bei manchen Regionen möglich, bei anderen aber nicht.

Die Gesamtkonzentration an Prolin, Leucin und Phenylalanin und ihr Enantiomerenverhältnis wurden mittels HPLC bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der Leucingehalt am stärksten variiert und dass mit Hilfe des Enantiomerenverhältnisses die Auswirkungen der Lagerung, das Alter und die Verarbeitungstechnik untersucht werden können

Mittels SDS-PAGE und hochauflösender zwei-dimensionaler Elektrophorese wurden Proteine untersucht, die nur in Spuren im Honig zu finden sind, doch die gefundenen Proteinbestandteile stammten hauptsächlich von den Bienen, nicht von den Pflanzen.

Der Gesamt-Stickstoffgehalt wurde verwendet, um den Zusatz von Zuckern nachzuweisen. Bei Gehalten von 10 mg Stickstoff pro 100 g Honig wurde eine Verfälschung angenommen.

Aminosäure-Muster scheinen zur Bestimmung der botanischen und geographischen Quelle von Honigproben besser geeignet zu sein als die Protein-

zusammensetzung. Aminosäure-Profile liefern einen Hinweis auf die pflanzliche Herkunft. Eine verlässliche Identifizierung der Ursprungsregion liefert allerdings nur eine Kombination mit anderen Techniken [31].

3.5.3.5 Aromastoffe

Geschmack und Geruch von Honig hängen stark von flüchtigen organischen Verbindungen ab, deren Verteilung vom pflanzlichen Ursprung und der Verarbeitungsmethode abhängen.

Das größte Problem bei der Untersuchung der Aromakomponenten ist die Isolierung der flüchtigen Verbindungen. Am meisten wird das simultane Destillations-Extraktionssystem von Likens und Nickerson und Modifizierungen von diesem verwendet. Bei der Isolierung bei höheren Temperaturen führt es zu Veränderungen der Aromastoffe und es entsteht ein „gekochter“ Honiggeschmack, der von HMF und Furfural herrührt. Die Extraktion im Vakuum kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden, was die Veränderungen verhindert. Man erhält eine komplexe Mischung aus Kohlenwasserstoffen, Alkoholen, Phenolen, Ethern, Aldehyden, Ketonen, Furanen und Stickstoffverbindungen.

Für die GC-MS werden die flüchtigen Verbindungen an ein Adsorberharz gebunden und mittels thermischer Desorption für die Analyse wieder freigesetzt. Mit dieser Methode sind mehr Verbindungen analysierbar als mit Headspace-GC-MS und sie ist empfindlicher. Die Methode kann zusammen mit der Pollenanalyse zur Überprüfung der pflanzlichen Quelle herangezogen werden.

Die Analyseergebnisse von Aromastoffen hängen von der Isolierungstechnik und der Detektionsmethode ab. Außerdem hängt das Aroma nicht nur von der Herkunft des Nektars, sondern auch von Verarbeitung und Lagerung ab. Eine vorsichtige Untersuchung der flüchtigen Verbindungen könnte zur Bestimmung der pflanzlichen Abstammung von Honig dienen. Es könnten sortentypische Verbindungen identifiziert werden. Die Aromastoff-Analyse sollte zur eindeutigen Identifizierung mit der Untersuchung von anderen Honiginhaltsstoffen kombiniert werden [31].

3.5.3.6 Enzymaktivität

Die Enzymaktivität ist ein Maß für die Hitzebehandlung von Honig während der Verarbeitung und Lagerung. Sie ist aber weniger exakt als die Bestimmung der HMF-Konzentration, da die Bienen unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Mengen an Speichelenzymen zusetzen. Die Diastaseaktivität liefert einen Hinweis auf Pasteurisierung. Enzymaktivitäten eignen sich nicht zur Untersuchung der Herkunft von Honig [31].

3.5.3.7 Fermentationsprodukte

Der Gehalt an Fermentationsprodukten hängt von den Mikroorganismen in Honigtau und Nektar ab und liefert Informationen über die Verarbeitung von Honig (Pasteurisierung). Die Analyse der Fermentationsprodukte scheint kein geeignetes Mittel zur Bestimmung des botanischen oder regionalen Ursprungs eines Honigs zu sein [31].

3.5.3.8 Mineralstoffe und Spurenelemente

Die Analyse von Mineralstoffen und Spurenelementen in Honigproben könnte zur Bestimmung der regionalen Herkunft herangezogen werden, da diese Werte stark von der Umweltverschmutzung beeinflusst werden. Die Untersuchung der Spurenelement-Muster und die anschließende statistische Bewertung der Daten ist eine viel versprechende Methode [23, 31].

Untersuchungsmethoden, die häufig eingesetzt werden, sind z.B. Ionenchromatographie von anorganischen Anionen, Neutronenaktivierungsanalyse von Spurenelementen und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) mit Graphitofen. Die Spurenelementkonzentration in Honigproben aus Industriegebieten ist höher als in anderen Regionen, speziell von Cadmium, Kupfer, Blei und Zink.

3.5.3.9 Aliphatische organische Säuren

Typische Analysenmethoden für die Untersuchung von aliphatischen organischen Säuren sind SPE gefolgt von HPLC oder GC-MS. Über die Zusammensetzung der organischen Säuren gibt es nur wenige Publikationen. Eine Analyse dieses Profils und die Bewertung der Ergebnisse durch statistische Methoden könnten zusätzliche, hilfreiche Informationen über Honigproben aus unterschiedlichen Quellen liefern [31].

3.5.3.10 Phenolische Verbindungen (außer Flavonoide)

Während des sekundären Metabolismus von Pflanzen entstehen Benzoe- und Hydroxyzimtsäuren. Die Konzentrationen dieser Verbindungen unterscheiden sich in den verschiedenen Pflanzen.

Die Analyse aromatischer Carbonsäuren (Phenolsäuren) mittels GC-MS nach Methylierung zeigte sortenspezifische Unterschiede. So enthält Rapshonig Propan-säure und Buchweizenhonig eine höhere Konzentration von 4-Hydroxybenzoesäure und keine Phenylelessigsäure. Heidekrauthonig könnte an Hand hoher Gehalte an Benzoe-, Phenylelessig-, Mandel- und β -Phenylmilchsäure identifiziert werden. Zur Unterscheidung von Honigtauhonigen von anderen könnte die Konzentration an Protocatechusäure dienen [31].

Phenolsäuren wurden auch mittels HPLC in Kombination mit einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor untersucht. Die Phenolsäuremuster erlaubten hier eine Unterscheidung zwischen Raps- und Robinienhonig [46].

Aromatische Carbonylverbindungen, die durch sekundäre enzymatische Reaktionen aus den entsprechenden Phenolsäuren entstehen, führen zu intensivem Geschmack und Geruch. Man findet sie in geringen Konzentrationen in Honig. Die Analyse dieser Verbindungen mittels GC-MS gab keinen Hinweis auf die botanische Quelle der Honigproben [31].

3.5.3.11 Hauptisotope

Wie bereits erwähnt, wird Honig oft mit HFCS verfälscht. Carbon Stable Isotopic Ratio Analysis (C-SIRA) wurde zum Nachweis der Verfälschung (mit Maissirup oder Rohrzucker) verschiedenster Lebensmittel (Honig, Ahornsirup, Apfelsaft, usw.) verwendet. Die Kopplung eines Elemental Analyzer mit einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer ermöglicht eine „on-line“ Isotopenmessung [31].

Zur Analyse von strukturell ähnlichen Disacchariden (Glucose-Glucose und Glucose-Fructose) und von der komplexen Mischung der Disaccharide, die in geringen Mengen vorkommen, wurde ^{13}C -NMR verwendet. Für eine leichtere Interpretation der ^{13}C -Daten kann zusätzlich eine ^1H -NMR durchgeführt werden [23, 31].

Kohlenstoff-SIRA bezüglich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte erlaubt den Nachweis von Zuckerzusatz (Maissirup, Rohrzucker) zu Honig. Diese Methode eignet sich aber nicht zur Ermittlung des botanischen oder geographischen Ursprungs [31].

3.5.3.12 Mögliche Markersubstanzen

Die Bestimmung spezieller Markersubstanzen erleichtert die Ermittlung der Honigquelle. Aber solche Verbindungen sind nicht für alle botanischen Varianten bekannt und wenn doch, findet man sie oft nur in sehr geringen Mengen. Weiters variieren die Konzentrationen dieser Verbindungen oft erheblich, da Honig ein natürliches Produkt ist. Einige dieser Substanzen sind leicht erhältlich und könnten daher mit der Absicht der Verfälschung dem Honig zugesetzt werden [31].

Bei der HPLC-EI-MS-Analyse von portugiesischen Heidekrauthonigfraktionen wurden zwei organische Säuren in hohen Konzentrationen nachgewiesen. Diese wurden isoliert und als cis,trans-Abscisinsäure und trans,trans-Abscisinsäure identifiziert. Diese beiden Verbindungen wurden bisher in noch keiner anderen Honigsorte gefunden und könnten daher Marker für Heidekrauthonig sein [47].

Das Glykosid Hesperidin ist eine grundlegende Verbindung im Zitrusnektar. Das zugehörige Aglykon Hesperetin wurde bis jetzt nur in Zitrushonigen gefunden und könnte daher zur Identifizierung dieser Honigsorte dienen [48].

Anthranilsäuremethylester ist eine flüchtige Verbindung in Zitrusnektar und -honig und wurde mittels GC-MS/-FID oder spektrophotometrischen Methoden bestimmt und als Marker für Zitrushonige verwendet. Mittels HPLC können HMF und Anthranilsäuremethylester simultan bestimmt werden. Anthranilsäuremethylester ist aber eine flüchtige Verbindung, daher erfährt sie merkliche Konzentrationsänderungen, abhängig von den Umwelt- und Lagerbedingungen [5, 31].

3-Aminoacetophenon ist die Hauptkomponente der flüchtigen Verbindungen in Kastanienhonigen und könnte spezifisch für die Kastanie als Nektarquelle sein [31].

3.6 Flavonoidanalytik in Honig

Von den Flavonoiden wird angenommen, dass sie mittels Pollen und Nektar in den Honig gelangen. Daher hofft man, über das Flavonoidmuster einer Honigprobe ihren botanischen Ursprung bestimmen zu können. Es wurde auch der Zusammenhang des Flavonoidgehalts mit der geographischen [27, 28, 49-51] und entomologischen [27, 28] Herkunft untersucht. Zur Untersuchung der Flavonoide in Honig wurden verschiedene Methoden entwickelt: Dünnschichtchromatographie (TLC), Gaschromatographie (GC), HPLC und Kapillarelektrophorese (CE).

3.6.1 Probenvorbereitung

Das Ziel der Probenvorbereitung ist, die zu untersuchenden Verbindungen anzureichern und möglichst alle störenden Matrixkomponenten zu entfernen. Bei der am häufigsten verwendeten Extraktionsmethode handelte es sich um eine Festphasen-Extraktion, die folgendermaßen funktioniert: die Honigprobe wurde mit 5 Teilen Wasser (pH 2 mit HCl) vermischt, bis sie vollständig gelöst war und dann über Watte filtriert. Das Filtrat wurde auf eine Amberlite XAD-2-Säule aufgegeben. Die phenolischen Verbindungen verblieben auf der Säule, während Zucker und andere polare Verbindungen mit dem wässrigen Lösungsmittel eluierten. Die Säule wurde zuerst mit Wasser (pH 2 mit HCl) und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde die Phenolfraktion mit Methanol eluiert und im Rotavapor das Lösungsmittel unter reduziertem Druck bei 40°C entfernt. Es gibt eine Abwandlung dieser Extraktion, bei der das Honigfiltrat mit dem Harz vermischt und zehn Minuten mit dem Magnetrührer gerührt wurde, bevor man das Gemisch in die Säule gefüllt hat [52].

Für den folgenden Reinigungsschritt wurden verschiedene Methoden angewendet. Bei der ersten wurde der Rückstand in Methanol gelöst über eine Sephadex LH-20 Säule aufgereinigt. Die phenolische Fraktion wurde unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht, wieder in Methanol aufgenommen und filtriert [26, 27, 49, 50, 53-55]. Diese Extraktionsmethode hat einige Nachteile: sie ist sehr zeitraubend, das Material ist teuer, man muss die Banden in einem dunklen Raum unter UV-Licht beobachten und die Trennung der Flavonoide von den zuvor

eluierenden Phenolsäuren ist nicht immer klar erkennbar [50]. In vielen Arbeiten wurde die Aufreinigung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erreicht. Dafür wurde der Rückstand in destilliertem Wasser resuspendiert und 3 mal mit Diethylether extrahiert. Aus den vereinigten Etherextrakten wurde durch Ausblasen mit Stickstoff das Lösungsmittel entfernt. Der trockene Rückstand wurde in Methanol gelöst und filtriert [28, 44, 50-52, 56-73]. Weston et al. [74] verwendeten bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion 2-Butanol anstelle von Diethylether. Der alkoholische Extrakt wurde bei 40°C im Vakuum getrocknet, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

In einer Publikation wurden verschiedene Festphasen-Materialien (Amberlite XAD-2, C18-Bond Elut, Strata-X und Oasis HLB) zur Extraktion einer Standardlösung aus Phenolsäuren und Flavonoiden verwendet und miteinander verglichen [75]. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich C₁₈-Phasen am wenigsten eignen. Mit Phenolsäuren und Flavonoiden versetzte Honige wurden mittels Amberlite und Oasis extrahiert und die Wiederfindungen miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass Flavonoide mit beiden Materialien ähnlich gut extrahiert werden, Phenolsäuren wesentlich besser mit der Oasis-Phase.

Ein anderes Festphasensystem wurde von Pulcini et al. [76] verwendet. Die Honigprobe wurde in zwei Teilen Wasser (HPLC grade, pH 2 mit HCl) gelöst, auf eine konditionierte Phenomenex Strata SDB-L-Kartusche aufgetragen, mit angesäuertem Wasser (pH 2 mit HCl) und Wasser gewaschen und mit Methanol/Acetonitril (2:1, v/v) eluiert. Die gesammelten Extrakte wurden mit 1 N Natriumhydroxidlösung auf pH 7 gebracht, auf Strata SAX-Kartuschen aufgetragen, wie zuvor gewaschen und mittels 1 N Schwefelsäure eluiert. Die Wiederfindung der Flavonoide lag über 90%.

Pichichero et al. [77] verwendeten eine DSC-C₁₈-Kartusche ohne zusätzlichen Aufreinigungsschritt. Dafür wurde der Honig in zwei Teilen einer Lösung von Methanol und 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in destilliertem Wasser (70:30, v/v) im Ultraschallbad eiskühlt gelöst und auf die konditionierten Kartuschen aufgebracht. Die Säulen wurden mit 0,1% TFA in Wasser gewaschen und die Polyphenole mit Methanol eluiert. Die Extrakte wurden im Rotationsverdampfer bei 40°C getrocknet und der Rückstand in Methanol gelöst.

Truchado et al. [72] setzten alternativ zum Amberlite-Harz eine Sep-Pak-Kartusche ohne weitere Aufreinigungsschritte ein. Damit konnten Flavonoid-

Glykoside, die man in *Robinia*-Nektar findet, auch im *Robinia*-Honig nachgewiesen werden. Die XAD-2-Extraktionsmethode mit nachfolgender Etherextraktion eignete sich nicht zur Extraktion der polaren Glykoside.

Auch eine Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode wurde zur Anreicherung der phenolischen Verbindungen verwendet. Amiot et al. [78] reinigten den Honig durch Mischen mit 2 Teilen Petrolether mit Hilfe eines Ultraturax. Nachdem sich das Gemisch getrennt hatte, wurde die zähe Masse 3 mal mit Ethylacetat extrahiert, nachdem ihr Ammoniumsulfat und m-Phosphorsäure zugesetzt wurden. Die vereinigten Extrakte wurden getrocknet, das organische Lösungsmittel bei 40°C unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und über einen 0,5 µm PTFE-Filter filtriert.

3.6.2 Chromatographische Methoden

Die am häufigsten verwendete chromatographische Technik zur Bestimmung von Polyphenolen ist die HPLC, aber es wurden auch schon GC und TLC angewendet.

Weston et al. [74] verwendeten eine GC-MS-Technik zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Flavonoiden und Phenolsäuren in Honig. Der Nachteil dieser Methode ist die notwendige Derivatisierung (Methylierung).

Auch HP-Dünnschichtchromatographie wurde manchmal zur Bestimmung von Flavonoiden in Honig eingesetzt. Amiot et al. [78] trennten die Flavonoide auf Cellulose in der ersten Dimension mit 15%iger Essigsäure, in der zweiten mit Benzol/Essigsäure/Wasser (125:72:3, v/v) auf. Die Bestimmung erfolgte nach Anfärben unter UV-Licht bei 366 nm. Bei Guerrini et al. [26] wird Silikagel ohne Fluoreszenzindikator als stationäre Phase verwendet, auf dem die Substanzen zuerst mit Ethylacetat/Ameisensäure/Essigsäure/Wasser (100:11:11:27, v/v/v/v) und anschließend mit Toluol/Ethylacetat/Essigsäure (50:45:5, v/v/v) aufgetrennt wurden. Die Substanzen wurden entweder durch Messung der Extinktion bei 240 nm oder durch Messung der Emissionsintensität bei 400 nm nach Anregung bei 365 nm bestimmt.

Bei den HPLC-Methoden wurden in den Studien verschiedenste Extraktionssysteme, mobile und stationäre Phasen und Detektoren verwendet, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind. Am häufigsten wurde Umkehrphasen-HPLC mit

unpolaren Octadecylsilan(C₁₈)-gebundenen Phasen mit polaren mobilen Phasen benützt.

Im Großteil der publizierten Studien wurde mittels eines Gradientenprogramms eluiert. Meistens handelt es sich um ein binäres System aus einer polaren wässrigen Komponente und einem weniger polaren organischen Lösungsmittel, wie z.B. einer wässrigen Ameisensäurelösung und Methanol.

Die mit Abstand am häufigsten angewendete Detektionsmethode ist UV-vis-Detektion mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD). Seltener werden Massenspektrometer [52, 64, 68, 72, 75, 76] oder elektrochemische Detektionssysteme [79] verwendet.

UV-vis-Detektion wird am häufigsten bei den Wellenlängen 290 und 340 nm durchgeführt. Da Polyphenole mehrere Absorptionsmaxima zeigen, werden Photodiodenarrays verwendet, die Chromatogramme bei jeder Wellenlänge zusammen mit dem Absorptionsspektrum jeder eluierenden Bande liefern. Dadurch können Retentionsparameter und Absorptionsspektrum zur Identifizierung einer Verbindung herangezogen werden. Es ist bekannt, dass alle Polyphenole bei 290 nm absorbieren, trotzdem werden in einigen Studien andere Wellenlängen verwendet, um für die untersuchten Flavonoide maximale Empfindlichkeit und Selektivität zu erreichen.

Die Identifizierung der Polyphenole erfolgt im Allgemeinen durch den Vergleich von Retentionszeiten, UV-Spektren und Chromatogrammen der Probenbestandteile mit Standardsubstanzen. Als komplementäre Technik wird manchmal MS und NMR-Spektroskopie verwendet [52, 64].

Tabelle 3: HPLC-Methoden zur Auftrennung von Flavonoiden in Honig

Referenz	Extraktionssystem	Säule	mobile Phase	Elution	Detektion
[49]	Amberlite XAD-2 und Sephadex LH-20	LiChrocart RP-18	Methanol/Wasser/ Essigsäure (50:47:3)	isokratisch	DAD bei 340 nm
[50]	Amberlite XAD-2 und Sephadex LH-20 oder Etherextraktion	LiChrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[55]	Amberlite XAD-2 und Sephadex LH-20	LiChrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[56]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	LiChrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[80]	keines (konzentrierter Honig)	Lichrosorb RP-18	A: Wasser (pH 2 mit o- Phosphorsäure) B: Acetonitril	Gradient	DAD bei 310 nm
[52]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm, EI-MS und 1H-NMR

[57]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 340 nm
[59]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[58]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[44]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	XTerra RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 285 und 340 nm
[65]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[66]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[61]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Discovery C-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Acetonitril	Gradient	DAD und ESI-MS
[62]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrospher 100 RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[63]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrospher 100 RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm
[60]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 350 nm
[64]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm; EI-MS; ¹ H-NMR
[70]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Oasis HLB 3cc	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 254 - 400 nm
[78]	Flüssig-Flüssig-Extraktion (Petrolether-Ethylacetat)	Chromspher RP-C18	A: Wasser (pH 2 mit o-Phosphorsäure) B: Acetonitril	Gradient	DAD bei 200 - 400 nm
[54]	Amberlite XAD-2 und Sephadex LH-20	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 340 nm
[51]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	LiChrospher 100 RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	UV-vis bei 340 nm
[27]	Amberlite XAD-2 und Sephadex LH-20	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 280 und 340 nm
[28]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrocart RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 340 nm
[77]	SPE: DSC-C18	Whatman ODS-2	A: Wasser/TFA/Acetonitril (87:3/10) B: Wasser/TFA/Acetonitril (40:50:10)	Gradient	DAD bei 280 und 360 nm
[73]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Lichrospher RP-18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	UV bei 270 nm
[79]	keines (gelöst in Wasser)	Zorbax SB-C18	A: 4% Essigsäure in Wasser B: MeOH	Gradient	DAD bei 288 und 320 nm; elektrochemische Detektion bei +1 V
[75]	SPE: Amberlite XAD-2 / Oasis HLB / StrataX / C-18	Ascentis	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	UV-vis und Fluoreszenzdetektion; ESI-MS
[76]	SPE: SDB-L und SAX	Phenomenex Luna C18	A: Wasser/Ameisensäure (19:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 340 nm; ESI-MS
[72]	Sep-Pak oder Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	LiChrocart RP-18	A: Wasser/Essigsäure (99:1) B: Methanol	Gradient	DAD bei 290 und 360 nm; MS-MS im negativen Modus
[68]	Amberlite XAD-2 und Etherextraktion	Phenomenex Luna C18	A: Wasser/10% Methanol/1% Essigsäure B: Methanol	Gradient	UV bei 254 nm; ESI-MS
[74]	Amberlite XAD-2 und Extraktion mit 2-Butanol	Alltech Econosil	Wasser/Essigsäure A: (98:2) B: (2:98)	Gradient	UV bei 280 nm

3.6.3 Elektrophoretische Methoden

Als eine Alternative zur HPLC-Trennung von phenolischen Verbindungen wurden einige Kapillarelektrophorese(CE)-Methoden entwickelt. Die CE hat gegenüber der HPLC einige Vorteile, wie kurze Analysenzeiten, Einfachheit, niedrige Betriebskosten und hohe Trenneffizienz hinsichtlich von Polyphenolen. Sie erlaubt ein schnelles Screening von phenolischen Verbindungen in Honig. Trotz der positiven Aspekte der CE wurde sie nur in wenigen Studien zur Analyse von Flavonoiden in Honig benützt.

Bei den angewendeten Methoden handelt es sich um CZE mit Borat- [53] oder Ammoniumacetatpuffer [67, 71] oder um Micellare Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC) mit Boratpuffer und SDS als Mizellen-bildendes Agens [54]. UV-vis- Detektion [53, 54, 67, 71] mit DAD und Massenspektrometrie [67] werden zur Detektion der Flavonoide verwendet.

3.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Honig ist ein begrenztes Naturprodukt, das je nach Sorte und Herkunftsland unterschiedliche Preise erzielt. Eine eindeutige Charakterisierung der Honige und damit eine Feststellung der Sortenreinheit ist daher eine sehr wichtige Aufgabe. Da die derzeitige Standardmethode, die Pollenanalyse, nur von gut geschultem, erfahrenem Personal durchgeführt werden kann und bei manchen Honigsorten, wie z.B. Zitrushonigen, nur geringe Mengen an spezifischen Pollen enthalten sind, versucht man neue Methoden zur Identifizierung einer Honigsorte zu entwickeln. Diese Methoden untersuchen die Profile verschiedener Substanzgruppen, wie organischer Säuren, Aromastoffe oder phenolischer Verbindungen, die im Honig in geringen Mengen vorkommen. Ziel ist es, sortenspezifische Markersubstanzen oder sortentypische Substanzmuster zur schnellen und eindeutigen Charakterisierung eines Honigs zu ermitteln.

Phenolische Verbindungen, wie die Flavonoide, die von den Blüten stammen, von denen die Bienen den Nektar sammeln, könnten zur Sortenidentifizierung beitragen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte daher eine analytische Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Flavonoiden entwickelt werden.

Bisher wurde zur Untersuchung von Flavonoiden in Honig hauptsächlich Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Photodiodenarray-Detektion verwendet (siehe Kapitel 3.6). Die Extraktion erfolgte meistens mittels Festphasenmaterialien, wie z.B. dem nichtionischen Polymerharz Amberlite XAD-2.

In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob sich die Accelerated Solvent Extraction (ASE) zur Extraktion der Flavonoide aus der stark zuckerhaltigen Matrix eignet. Zur Auftrennung und Detektion sollte die HPLC mit einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor (CEAD) eingesetzt werden. Diese elektrochemische Detektionsmethode zeichnet sich durch höhere Empfindlichkeit und Selektivität aus als der in den meisten Studien verwendete Dioden-Array-Detektor und ist daher erfolgversprechend.

4 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

4.1 Aufarbeitung der Honigproben

4.1.1 Accelerated Solvent Extraction (ASE)

(zusammengefasst aus [81])

Bei der beschleunigten Lösungsmittlextraktion werden die Analyte durch geeignete Lösungsmittel, erhöhten Druck und erhöhte Temperatur aus diversen Matrices gelöst. Da man Lösungsmittel unterschiedlicher Polaritäten mischen kann, können viele Analyte gleichzeitig extrahiert werden. Es können zahlreiche Lösungsmittel verwendet werden, außer starke Säuren und Laugen.

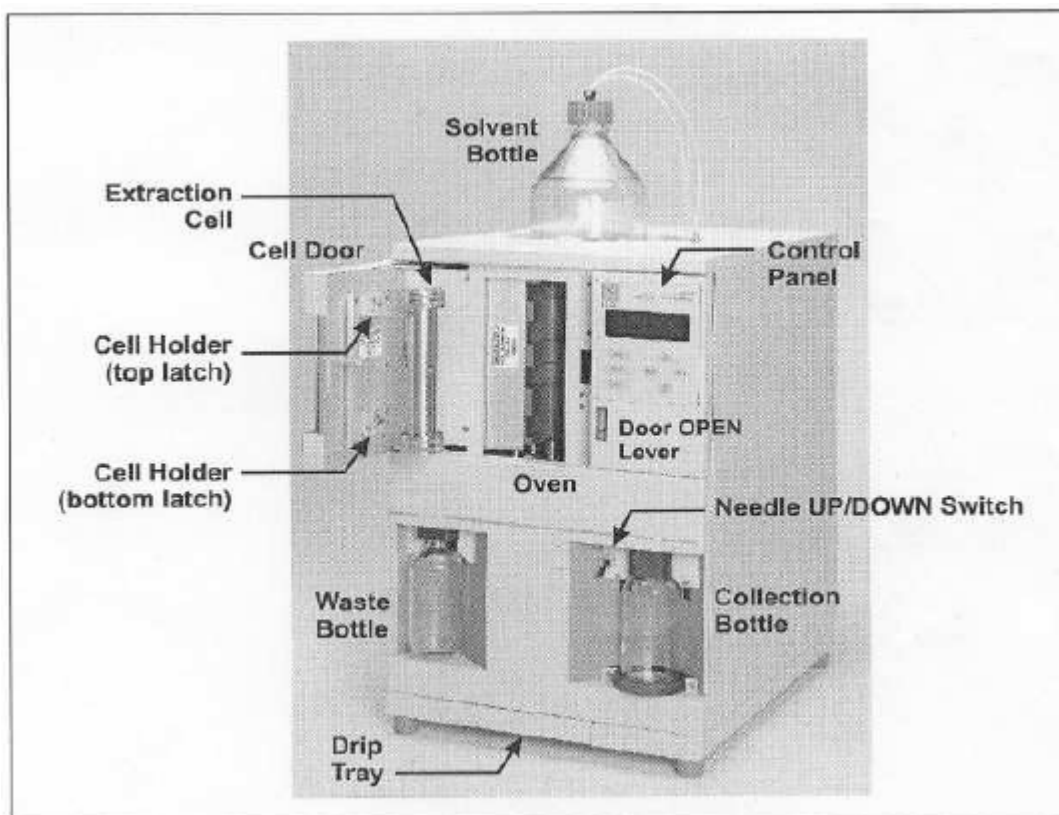


Abbildung 20: ASE-100, Dionex [81]

Das Lösungsmittel wird aus der Lösungsmittelflasche in die Extraktionszelle eingebracht. In der Zelle findet die Extraktion bei konstanter Temperatur und erhöhtem Druck in mehreren aufeinander folgenden Zyklen statt. Nach jedem Zyklus wird ein vordefiniertes Volumen in die Sammelflasche abgegeben, frisches Lösungsmittel aus der Vorratsflasche nachgeholt und ein neuer Zyklus gestartet. Nach der Extraktion wird die Apparatur mit Stickstoff gespült und damit eventuelle Lösungsmittelrückstände entfernt. Die gesammelten Extraktionsfraktionen können aus der Sammelflasche entnommen und gegebenenfalls weiterbehandelt werden.

4.1.2 Amberlite XAD-2-Harz

(zusammengefasst aus [82])

Das polymere Adsorbens ist ein verzweigtes Polystyrol-Divinylbenzol (Abbildung 21)-Copolymerharz, das in Form von 20-60 mesh großen harten, sphärischen und opaken Kügelchen erhältlich ist. Es hat eine große Porengrößen-Verteilung, eine große Oberfläche ($\geq 300 \text{ m}^2/\text{g}$), eine chemisch homogene nichtionische Struktur und ist temperaturstabil bis 200°C .

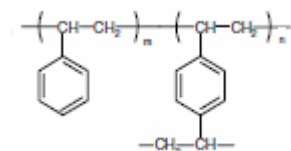


Abbildung 21: Polystyrol-Divenylbenzol-Grundgerüst [83]

Jede Harzperle (Abbildung 22) besteht aus einer Anhäufung von vielen, sehr kleinen Mikrosphären, was zu einer kontinuierlichen Gelphase und einer kontinuierlichen Porenphase führt. Beim Adsorptionsprozess wird der hydrophobe Teil des adsorbierten Moleküls bevorzugt an der hydrophoben Polystyrol-Oberfläche adsorbiert, während der hydrophile Teil in Richtung wässrige Phase zeigt. Die adsorbierten Substanzen wandern nicht notwendigerweise in die Mikrosphären, sondern bleiben normalerweise an der Oberfläche adsorbiert. Daher können die adsorbierten Verbindungen, wegen der hohen Diffusionsrate der mobilen Phase durch die Porenstruktur jeder Perle, mit geeigneten Elutionsmitteln schnell eluiert werden.

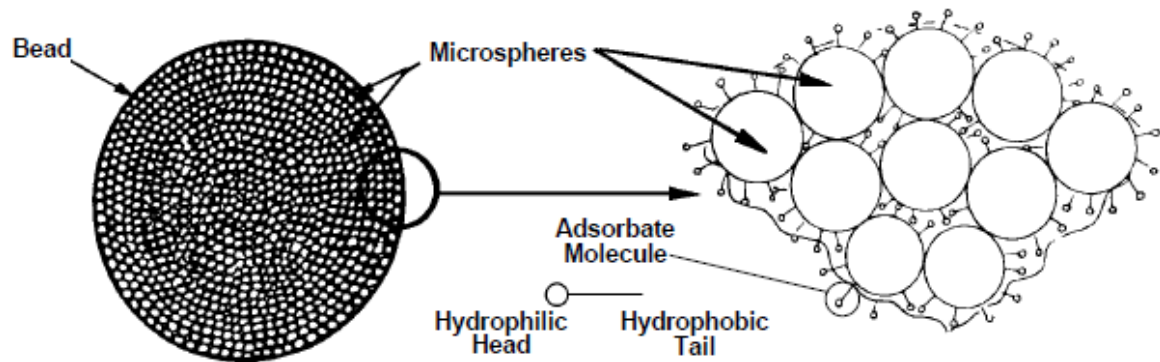


Abbildung 22: Struktur eines hydrophoben Amberlite XAD-2-Harz-Kügelchens [82]

Die Selektivität und das Ausmaß der Adsorption von löslichen organischen Verbindungen durch Amberlite XAD-2 nimmt mit der Hydrophobizität des adsorbierten Moleküls zu. Bei den Adsorptionskräften handelt es sich in erster Linie um van der Waals-Kräfte, daher kann das Ausmaß der Adsorption durch Veränderung des hydrophoben-hydrophilen Gleichgewichtes geändert werden. So werden z.B. schwache Säuren in ihrer sauren Form stärker adsorbiert als in Salzform.

4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

(zusammengefasst aus [84, 85])

4.2.1 Grundlagen

Mittels chromatographischer Methoden ist es möglich, chemisch ähnliche Verbindungen in komplexen Gemischen zu trennen. Das Trennprinzip beruht auf der Verteilung zwischen zwei nicht mischbaren Phasen. Als mobile Phase können Flüssigkeiten, Gase oder superkritische Fluide verwendet werden, als stationäre Phasen können Feststoffe oder Flüssigkeiten eingesetzt werden.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Hochleistungsflüssigchromatographie zur Auftrennung eingesetzt wurde, wird in den folgenden Abschnitten nur auf diese Methode näher eingegangen.

Die Probe wird in der mobilen Phase gelöst und diese dann durch die stationäre Phase bewegt, dabei verteilen sich die Probenkomponenten zwischen den Phasen. Verbindungen, die stark von der stationären retardiert werden, wandern nur langsam mit der mobilen Phase mit und umgekehrt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten werden die Probenkomponenten aufgetrennt und es kann sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse durchgeführt werden. Das resultierende Elutionsprofil der Probelösung in Form von Peaks nennt man Chromatogramm.

Bei der Wanderung entlang der Säule entfernen sich die Substanzpeaks voneinander, dabei kommt es aber auch zu einer Peakverbreiterung, die die Trennleistung herabsetzt.

Die Quantifizierung kann über die Peakhöhe oder über die Peakfläche erfolgen. Bei der Auswertung über die Peakhöhe müssen die Säulenbedingungen, wie Säulentemperatur, Flussrate und Geschwindigkeit der Probeninjektion konstant gehalten werden, um richtige Ergebnisse zu liefern. Die Peakhöhe verändert sich mit fortschreitender Laufzeit durch Peakdispersion. Daher wird die Quantifizierung über die Peakflächen, die von diesen Bedingungen unabhängig sind, bevorzugt. Die Peakbreite wird stark von der Trennleistung der Säule bestimmt.

4.2.2 Aufbau einer HPLC-Apparatur

In Abbildung 23 ist der schematische Aufbau eines HPLC-Gerätes dargestellt.

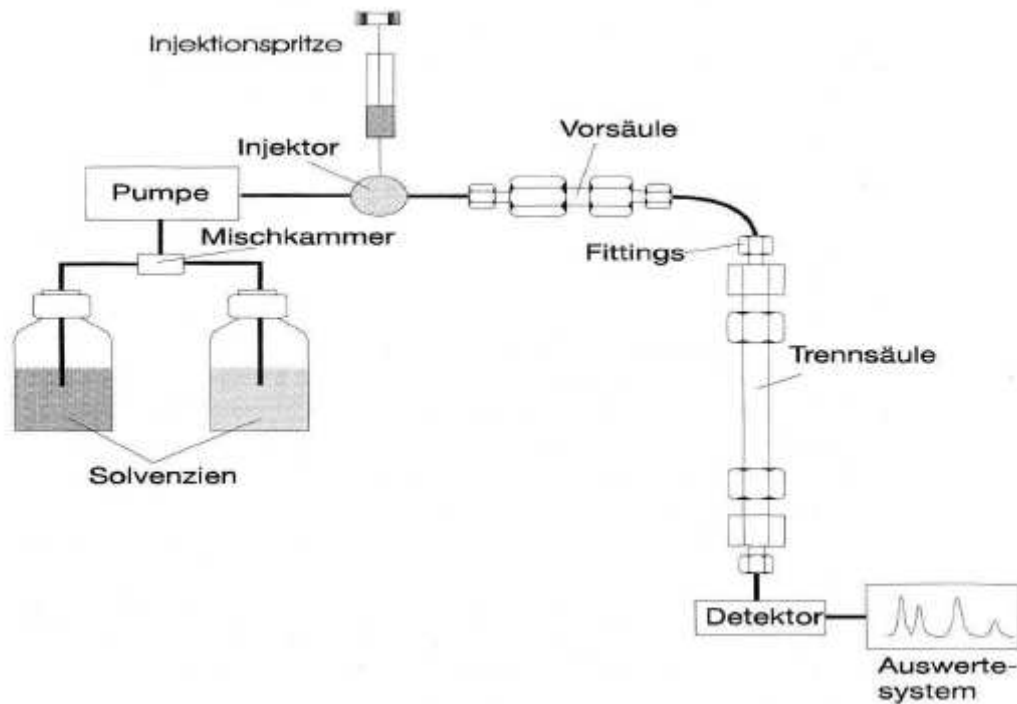


Abbildung 23: Aufbau eines HPLC-Systems [84]

In der Mischkammer werden die mobilen Phasen aus den Reservoirflaschen in einem bestimmten Verhältnis miteinander vermischt. Bei isokratischer Elution bleibt dieses Verhältnis über den gesamten Lauf konstant. Bei der Gradientenelution ändert sich die Zusammensetzung des Elutionsmittels während eines Laufs nach einem bestimmten Programm. Die mobile Phase wird mittels einer Pumpe mit einer zuvor eingestellten Flussrate durch das System transportiert. Die Probelösung wird entweder manuell mit einer Injektionspritze oder automatisch mittels Autosampler über einen Injektor in das System injiziert. Über eine kurze Vorsäule, die die eigentliche Trennsäule vor Verunreinigungen schützen soll, gelangt die Lösung zur chromatographischen Trennsäule. Dort werden die Komponenten der Lösung aufgetrennt und weiter zum Detektor transportiert. Die Detektorsignale und sämtliche andere Daten werden im Auswertesystem gespeichert. Diese Daten können mit einer geeigneten Software bearbeitet und ausgewertet werden. Nach dem Detektor wird das Elutionsmittel in einem Sammelbehälter aufgefangen.

4.2.3 „Reversed Phase“-Chromatographie

Die am häufigsten verwendete HPLC-Methode ist die Umkehrphasen-/RP-Chromatographie. Dabei werden, anders als bei der Normalphasenchromatographie, apolare stationäre Phasen und polare mobile Phasen verwendet. Daher wird bei der RP-Chromatographie die polarste Verbindung als erste eluiert. Die stationäre Phase besteht aus einem Trägermaterial, wie Kieselgel oder Aluminiumoxid, an dessen Oberfläche Alkylchlorsilane, meist mit n-Octadecyl- oder Octyl-Resten, gebunden sind. Je länger die gebundenen Kohlenwasserstoffketten sind, desto stärker werden die Verbindungen retardiert und desto besser ist die Trennleistung. Die Retentionszeit einer Substanz kann auch über die Zusammensetzung der mobilen Phase verändert werden. Typische mobile Phasen sind Mischungen von Wasser oder Puffer und mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln, wie Acetonitril, Methanol oder Tetrahydrofuran. Reines Wasser kann als mobile Phase nicht verwendet werden, weil sich aufgrund der apolaren stationären Phase für apolare Substanzen sehr lange Retentionszeiten ergeben würden. Weiters muss man darauf achten, dass der pH-Wert der mobilen Phase nicht über 7,5 liegt, da es bei höheren pH-Werten zur Zerstörung des Säulenmaterials durch Hydrolyse der Siloxane kommt.

Ein großer Vorteil der reversed-phase-Chromatographie ist, dass die Systemäquilibration nicht lange dauert, da sich das Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase rasch einstellt.

4.2.4 Chromatographische Parameter

Wie bereits erwähnt, beruht die Trennung in der Chromatographie auf der unterschiedlichen Verteilung der Probenbestandteile zwischen stationärer und mobiler Phase. Diese Verteilung wird durch den Verteilungskoeffizienten beschrieben:

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (4.1)$$

K.....Verteilungskoeffizient

c_SKonzentration des Analyts in der stationären Phase

c_MKonzentration des Analyts in der mobilen Phase

Die Probenkomponenten werden, je nach Stärke der Wechselwirkung mit der stationären Phase, unterschiedlich lange zurückgehalten und mit einer für sie typischen Retentionszeit t_R detektiert. Substanzen, die nicht retardiert werden, wie z.B. die Moleküle der mobilen Phase, erreichen den Detektor zur Zeit t_M , die auch Totzeit genannt wird. Die durchschnittlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Moleküle der mobilen Phase und der Analyte können durch folgende Gleichungen ermittelt werden:

$$v = \frac{L}{t_R} \quad (4.2)$$

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (4.3)$$

v.....Wanderungsgeschwindigkeit des Analyts

u.....Wanderungsgeschwindigkeit der mobilen Phase

t_RRetentionszeit des Analyts

t_MTotzeit

L.....Länge der Säule

Die Beziehung zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Verteilungskoeffizient wird mittels folgender Gleichung dargestellt:

$$v = \frac{1}{1 + K \cdot \frac{V_S}{V_M}} \quad (4.4)$$

V_SVolumen der stationären Phase

V_MVolumen der mobilen Phase

Aus (4.4) kann man eine substanzspezifische Größe, den Kapazitätsfaktor k' , ableiten. Der Kapazitätsfaktor ist eine dimensionslose Größe, die zur qualitativen Analyse herangezogen werden kann und die man direkt aus dem Chromatogramm erhält. Mit seiner Hilfe können unter unterschiedlichen Bedingungen erhaltene Analysenergebnisse miteinander verglichen werden.

$$k' = K \cdot \frac{V_S}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (4.5)$$

Ein weiterer wichtiger Parameter in der Chromatographie ist der Trenn- oder Selektivitätsfaktor α , der für zwei Substanzen A und B definiert ist als:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (4.6)$$

Die Trennstufenhöhe und die Trennstufenzahl sind zwei Größen mit deren Hilfe man die Effizienz einer Säule beschreiben kann. Sie sind über folgende Gleichung miteinander verknüpft:

$$N = \frac{L}{H} \quad (4.7)$$

NTrennstufenzahl

HTrennstufenhöhe

Die Trennstufen- oder Bodenhöhe ist als das Verhältnis zwischen der Varianz des Peaks und dessen Wanderungsstrecke definiert:

$$H = \frac{\sigma_t^2 \cdot L}{t_R^2} \quad (4.8)$$

σ_t^2 ... Varianz der Retentionszeit

Die Trennstufenzahl kann mittels der Retentionszeit und der Peakbasisbreite experimentell direkt aus einem Chromatogramm erhalten werden:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 \quad (4.9)$$

ω Basisbreite des Peaks

Den größten Einfluss auf die Peakbreite hat die Bodenhöhe. Für eine gute Trennleistung muss sie möglichst klein gehalten werden. Vier verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Bodenhöhe:

$$H = H_{diff} + H_{conv} + H_{ex,S} + H_{ex,M} \quad (4.10)$$

H_{diff} longitudinale Dispersion

H_{conv} radiale Dispersion oder EDDY-Diffusion

$H_{ex,S}$... Massenübergang zu und von der stationären Phase

$H_{ex,M}$... Massenübergang zu und von der mobilen Phase

Der Selektivitätsfaktor beschreibt nur die Trennleistung eines Phasensystems, die Effizienz einer Trennsäule hängt aber auch von der Trennstufenzahl und dem Kapazitätsfaktor ab. All diese Variablen sind über die chromatographische Auflösung miteinander verknüpft. Für den vereinfachten Fall, dass die Kapazitätsfaktoren der zu trennenden Verbindungen A und B sehr ähnlich sind, gilt:

$$R_{AB} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \frac{k'}{1 + k'} \quad (4.11)$$

R_{AB}Auflösung der Substanzen A und B

αSelektivitätsfaktor

k'Kapazitätsfaktor

Mit Hilfe der in vorangehender Gleichung dargestellten Zusammenhänge kann die Auftrennung eines Substanzgemisches optimiert werden. Am leichtesten kann in der Flüssigchromatographie der Kapazitätsfaktor manipuliert werden, da er stark von der Zusammensetzung der mobilen Phase abhängt. Der Selektivitätsfaktor wird ebenfalls am einfachsten durch eine Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase verändert. Auch der Wechsel auf eine andere Säulenpackung verändert den Selektivitätsfaktor. Wird eine Säulenpackung mit kleinerer Korngröße verwendet, wird dadurch die Trennstufenhöhe kleiner und die Effizienz verbessert. Die Trennstufenzahl lässt sich durch eine Verlängerung der Säule erhöhen.

Der Selektivitätsfaktor beeinflusst die Trennleistung und damit die Effizienz einer Säule am meisten.

4.3 Coulometrischer Elektroden-Array-Detektor (CEAD)

(zusammengefasst aus [86, 87])

4.3.1 Grundlagen

Chromatographisch aufgetrennte elektroaktive Verbindungen können mittels coulometrischen Elektroden-Array-Detektoren noch weiter elektrochemisch aufgelöst werden. An jeder der in Serie geschalteten Durchflusselektroden wird ein anderes Potential angelegt und der Strom simultan gemessen. Das resultierende Chromatogramm ist eine Darstellung von Strom gegen Zeit gegen Potential. In einem chromatographischen Lauf können die Analyte an Hand ihrer Retentionszeiten und ihrer Redoxpotentiale unterschieden werden. Die Detektion erfolgt mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit und liefert qualitative und quantitative Informationen.

Bei einer Kopplung mit HPLC, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, muss der mobilen Phase ein Leitelektrolyt für den Ladungstransport zugesetzt werden.

4.3.2 Elektroden

Die bis zu 16 in Serie geschalteten Durchflusselektroden des CEAD sind meistens aus porösem Graphit und zu Zellblöcken mit je vier Elektroden zusammengefasst. Die Anordnung der Elektroden ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich, werden 3 Elektroden in einer Durchfluszelle verwendet: Arbeitselektrode, Referenzelektrode und Hilfselektrode. Zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode wird ein konstantes Potential angelegt. Diese Potentialdifferenz ist die treibende Kraft für die Oxidation oder Reduktion des Analyts. Die Analytdetektion erfolgt durch Änderung des Stromes aufgrund der elektrochemischen Reaktion an der Oberfläche der Arbeitselektrode. Der gemessene Strom stammt aber nicht nur von der Umsetzung der Analyte, sondern auch von unerwünschten Redox-Reaktionen des Eluens (Faradaysches Rauschen) und vom Material der Arbeitselektrode (Nicht-Faradaysches Rauschen).

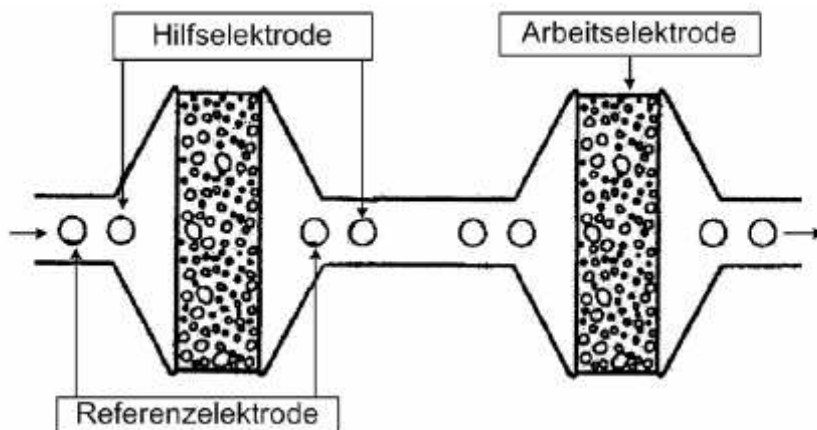


Abbildung 24: Darstellung zweier Durchflusselektroden eines CEAD-Systems (modifiziert aus [86])

In dieser Arbeit wurde poröser Graphit als Arbeitselektrode, Wasserstoff/Palladium als Referenzelektrode und Platin als Hilfselektrode verwendet. Wasserstoff-Palladium-Elektroden sind sehr beliebt in CEAD-Durchflusszellen, da sie aufgrund ihrer geringen Größe nahe bei der Arbeits- und Hilfselektrode platziert werden können, gegen Vergiftungen ziemlich resistent sind und auch hohe Drücke, bis zu 600 psi, aushalten.

4.3.3 Strom-Spannungskurven

Man erhält qualitative Information über den Analyt, wenn an die Elektroden ansteigende Spannungen in frei wählbaren Inkrementen angelegt werden und der fließende Strom gemessen wird. An den Elektroden, an denen die angelegte Spannung unter dem Halbstufenpotential des elektroaktiven Analyten liegt, wird nur ein kleiner Teil umgesetzt. Das größte Stromsignal entsteht an der Elektrode, deren Spannung dem Halbstufenpotential am ähnlichsten ist. An den anschließenden Elektroden wird das Signal wieder kleiner, da der Analyt schon weitgehend umgesetzt wurde. Das Auftragen der an den CEAD-Elektroden angelegten Potentiale gegen den an der entsprechenden Elektrode gemessenen Strom liefert Strom-Spannungskurven (Abbildung 30). Diese Kurven können sehr komplex werden, wenn in einer Verbindung mehrere elektrochemisch aktive Gruppen vorhanden sind, wie es bei Flavonoiden der Fall ist. Die Potentiale der Elektroden können in einem bestimmten Bereich frei gewählt werden. Die Strom-Spannungskurven sind für eine Substanz spezifisch und dienen daher zur Identifizierung.

4.3.4 Quantitative Information

Der Vorteil coulometrischer gegenüber anderen elektrochemischen Detektoren besteht darin, dass das Eluat nicht nur gegen eine Elektrodenoberfläche strömt, sondern durch die Elektrode hindurch fließt, daher wird der Analyt fast zu 100% umgesetzt. Das Faradaysche Gesetz besagt, dass der gemessene Strom der Konzentration des Reaktanden proportional ist. Daher kann aus dem registrierten Signal die Konzentration des Analyts errechnet werden:

$$I = z \cdot F \cdot c \cdot V \quad (4.12)$$

I.....gemessener Strom

z.....Zahl der ausgetauschten Elektronen

F....Faraday-Konstante (96485.3 C·mol⁻¹)

c.....Analytkonzentration

V....Fließgeschwindigkeit

Mit Hilfe einer Eichgerade kann sowohl über die Peakhöhe als auch über die Peakfläche eine Substanz quantifiziert werden. Unter der Annahme, dass der Analyt vollständig umgesetzt wird, kann über die Peakfläche ausgewertet werden, da die geflossene Ladungsmenge der Stoffmenge des Analyts proportional ist:

$$Q = z \cdot F \int_{t_1}^{t_2} I dt = z \cdot F \cdot n = z \cdot F \cdot \frac{m}{M} \quad (4.13)$$

Q.....geflossene Ladung

n.....Stoffmenge

m.....Masse

M.....Molmasse

4.4 Massenspektrometrie (MS)

(zusammengefasst aus [84, 85, 88])

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine wichtige analytische Methode zum Nachweis von chemischen Substanzen bis in den Spurenbereich, zur Quantifizierung und zur Strukturermittlung. Sie wird entweder direkt eingesetzt, um Reinsubstanzen oder Substanzgemische zu untersuchen, oder gekoppelt mit Trennmethoden wie HPLC, Gaschromatographie (GC) oder Kapillarelektrophorese (CE). Mittels MS können Atom- und Molekularmassen bestimmt werden.

Ein Massenspektrometer erzeugt aus den Bestandteilen einer Probe einen sich schnell bewegenden Strahl gasförmiger Ionen und trennt diese anschließend nach ihrem Masse-zu-Ladungs (m/z)-Verhältnis auf. Die Detektion der aufgetrennten Ionen liefert ein Massenspektrum, in dem die Intensitäten ein Maß für die relativen Mengen der entstandenen Ionen sind. Sie ermöglichen Rückschlüsse auf die Struktur von Analyten und die qualitative und quantitative Zusammensetzung von Gemischen. Um Kollisionen von Ionen mit Molekülen oder Atomen so gut wie möglich zu vermeiden, herrscht im Massenspektrometer ein Vakuum und zwar 10^{-3} bis 10^{-4} Pa in der Ionenquelle und bis zu 10^{-8} Pa im Analysatorteil.

Der schematische Geräteaufbau ist in Abbildung 25 dargestellt. Ein Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus folgenden Bauelementen:

- Probeneinlasssystem und Ionenquelle
- Massentrenn- oder Massenanalysatorsystem
- Detektor
- Datenverarbeitung

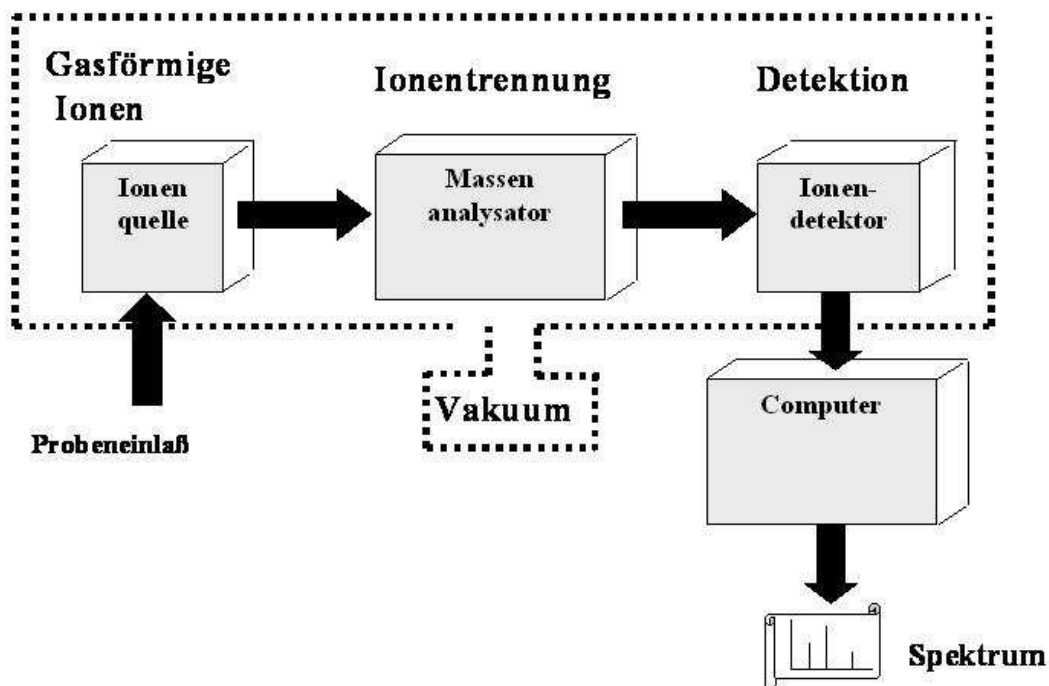


Abbildung 25: Aufbau eines Massenspektrometers [89]

4.4.1 Probeneinlasssystem und Ionenquelle

Im Einlasssystem wird die Probe verdampft und danach in der Ionenquelle ionisiert. Man unterscheidet direkten, indirekten und chromatographischen Probeneinlass. Die Kopplung von MS mit HPLC erfordert ein Interface, mit Hilfe dessen das Lösungsmittel aus der Säule gesplittet werden kann, da sonst bei den relativ großen Eluatmengen die für die MS benötigten Vakuumbedingungen nicht aufrecht erhalten werden könnten. Meistens sind Probeneinlass und Ionenquelle in einem Bauteil zusammengefasst.

Durch den Beschuss mit Elektronen (EI), Ionen (SIMS), Molekülen (CI, FAB), Photonen (MALDI) oder UV-Licht (PI), durch Anlegen von Hochspannung (FI/FD), durch einen Hochspannungsfunken (SSMS), durch ein thermisches Plasma (ICP/MS) oder durch elektrische (ESI) oder thermische (TSI) Energie werden die Verbindungen in der Ionenquelle in Ionen umgewandelt. Der Strom positiver (oder negativer) Ionen wird in Richtung Massenfilter beschleunigt.

Da bei der vorliegenden Arbeit ESI-MS verwendet wurde, wird diese Ionisationstechnik genauer beschrieben.

4.4.1.1 Elektrospray-Ionisation (ESI)

Bei diesen Sprayverfahren wird die Ionisierung erreicht, indem Nebeltröpfchen durch Verdampfung neutrale Lösungsmittelmoleküle verlieren, bis aufgrund von Abstoßung die positiv oder negativ geladenen Teilchen austreten (Abbildung 26). Da die Ionen bei Atmosphärendruck in die Gasphase übertreten zählen, die Sprayverfahren zu den API-Techniken (Atmospheric Pressure Ionization). Die Ionen gelangen über ein Blendensystem in das Massenspektrometer, das unter Hochvakuum steht.

Die ESI zählt zu den weichen Ionisationstechniken, bei denen teilweise hochgeladene Ionen, aber kaum Fragmente entstehen. Man erreicht den Austritt der Ionen durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes. Mittels hoher Spannungen an der Spitze der Kapillarnadel entsteht ein Flüssigkeitskonus (Abbildung 27) an dessen Ende sich die Tröpfchen bilden. Die entstandenen Ionen werden durch elektrische Felder abgelenkt und so von den neutralen Teilchen getrennt und in den Analysator weitergeleitet. Die ESI eignet sich zur Kopplung mit LC und Kapillarzonenelektrophorese (CZE), aber man sollte nur polare Lösungsmittel ohne Pufferzusatz verwenden, da Salze die Verkleinerung der Tröpfchen behindern.

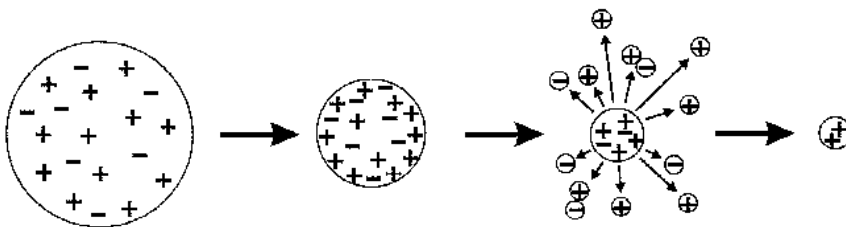


Abbildung 26: Ionenbildung bei Sprayverfahren [90]

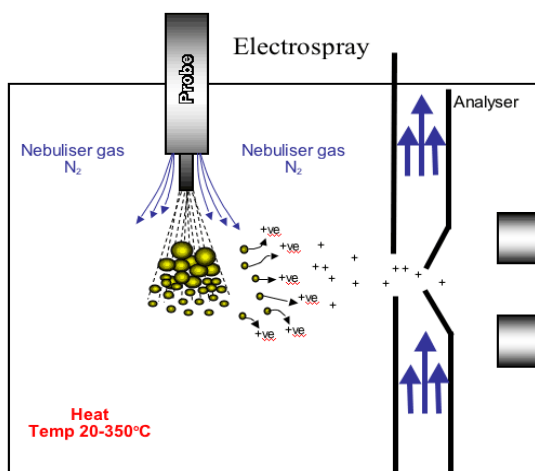


Abbildung 27: Tröpfchenbildung bei ESI [91]

4.4.2 Massenanalysatoren

Für ein Massenspektrum müssen die Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis aufgetrennt werden. Dazu werden sie zuerst auf eine bestimmte Geschwindigkeit gebracht und mit Hilfe eines schwachen Feldes zu einem Strahl gebündelt und über ein Potentialgefälle beschleunigt. Der Austrittsspalt lässt nur einen schmalen Streifen des Ionenstrahls durch. Die Geschwindigkeit der Ionen hängt von verschiedenen Faktoren ab:

$$e \cdot U = \frac{m \cdot v^2}{2}$$
$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot e \cdot U}{m}} \quad (4.14)$$

vGeschwindigkeit des Ions

eLadung des Ions

mMasse des Ions

UBeschleunigungsspannung

Die Auflösung R beschreibt die Fähigkeit eines Massenspektrometers, zwischen Massen zu differenzieren.

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (4.15)$$

mNennmasse des ersten Peaks

ΔmMassendifferenz zwischen zwei benachbarten Signalen, die gerade noch aufgelöst werden kann

Ein Massenanalysator sollte einerseits zwischen nur gering verschiedenen Massen unterscheiden können und andererseits für eine genügend große Anzahl an Ionen durchlässig sein. Diese beiden Ziele sind nur schwer gleichzeitig realisierbar.

Man unterscheidet je nach Trennmethode verschiedene Analysatorgeräte: Magnetfeld-Sektorgeräte, doppelt fokussierende Massenspektrometer, Quadrupol-Massenfilter, Ioneneinfanganalysatoren, Flugzeit(TOF)-Analysatoren und Fourier-Transform(FT)-Geräte.

4.4.2.1 Ionenfalle

Es gibt verschiedene Arten von Ionenfallen, nämlich Quadrupol-Ionenfallen, Linear Traps, Orbitraps, Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-MS und MS/MS.

In einer Ionenfalle können gasförmige Ionen durch elektrische und/oder magnetische Felder über einen längeren Zeitraum eingeschlossen werden. Eine herkömmliche Ionenfalle besteht aus einer zentralen Ringelektrode, an die eine veränderbare Hochspannung angelegt ist und zwei geerdeten Abschirmelektroden. Ionen mit geeignetem Masse-Ladungs-Verhältnis kreisen auf stabilen Umlaufbahnen in der „Falle“, die anderen prallen auf die Wände der Ringelektrode. Wird die Elektrodenspannung kontinuierlich verändert, werden die eingefangenen Ionen destabilisiert und verlassen das Innere der Ringelektrode in Richtung Detektor und man erhält ein Massenspektrum. Wird die Elektrodenspannung erhöht, werden die schweren Ionen stabilisiert und die leichteren destabilisiert. Man kann auch Ionen mit bestimmten m/z -Werten in der Falle gefangen halten und sie durch Stoßaktivierung fragmentieren, eine Technik, die in der Tandem-MS oft verwendet wird.

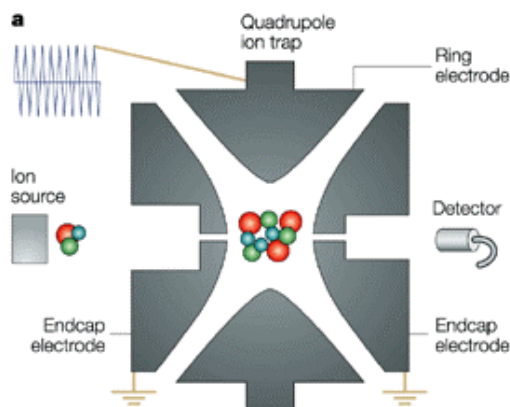


Abbildung 28: Schematische Darstellung einer Ionenfalle [92]

4.4.3 Detektor

Der Detektor wandelt die Ionenströme in ein auswertbares Signal um. Zu Beginn wurden Photoplatten verwendet, auf denen die unterschiedlich abgelenkten Ionen einschlagen, dabei die Platte schwärzen und so ein Linienspektrum liefern.

Eine weitere Möglichkeit zur Registrierung der Ionenströme stellen Faraday-Becher(/-Töpfe) dar. Die auftreffenden Ionen werden entladen, die Intensitäten der dabei entstehenden Ströme sind der Menge der Ionen proportional. Es können mehrere Töpfe nebeneinander verwendet werden, die jeweils eine Ionensorte mit bestimmtem Ablenkradius registrieren. Diese Methode eignet sich gut, wenn nur wenige Ionenarten detektiert werden sollen. Oder ein Topf wird hinter einem Kollektorspalt platziert, durch den nur Ionen mit einem bestimmten Ablenkradius durchtreten können.

Faraday-Becher wurden weitgehend von Sekundärelektronenvervielfachern (SEV), die eine bessere Empfindlichkeit und eine kürzere Ansprechzeit haben, verdrängt. Beim SEV steht jede nachfolgende Dynode unter höherer Spannung. Ein auftreffendes Ion schlägt aus der ersten Dynode Elektronen heraus, die zur zweiten Dynode hin beschleunigt werden und dort wieder Elektronen herausschlagen, usw. sodass eine Elektronenlawine entsteht. Wenn das Analysatorsystem energiereiche Ionen produziert, kann der SEV direkt hinter dem Austrittsspalt angeordnet werden. Bei Trennsystemen wie dem Quadrupol, die Ionen mit niedrigen kinetischen Energien erzeugen, muss der Ionenstrahl vorher auf mehrere keV beschleunigt werden.

In seltenen Fällen werden zur Registrierung auch Szintillationsdetektoren, Mikrokanalplatten, Daly-Detektoren oder Channeltrons verwendet.

5 MATERIAL und METHODEN

5.1 *Verwendete Chemikalien und Gebrauchsmaterialien*

Acacetin, $\geq 97,0\%$ (HPLC), Fluka

Acetonitril, HiPerSolv Chromanorm for HPLC – Gradient Grade, VWR

Amberlite XAD-2, Supelco

Ammoniaklösung 25%, AmalaR Normapur, VWR

Apigenin, $\geq 95,0\%$ (HPLC), Fluka

Bidestilliertes Wasser

Chrysin, Fluka

Diatomaceous Earth, ASE Prep DE, Dionex

Diethylether, (stabilisiert) zur Synthese, Merck

Essigsäure, Rotipuran 100% p.a., Roth

Essigsäureethylester, Rotisolv for HPLC, Roth

Ethanol, absolut, zur Analyse, Australco

Galangin, Aldrich

Hesperetin, $\geq 95,0\%$ (HPLC), Fluka

Isorhamnetin, $\geq 95,0\%$ (HPLC), Fluka

Kaliumdihydrogenphosphat, p.a., Merck

Kämpferol, $\geq 96\%$ (HPLC), Fluka

Luteolin, $\geq 99,0\%$ (TLC), Fluka

Methanol, HiPerSolv Chromanorm for HPLC – Gradient Grade, VWR

Myricetin, $\geq 96,0\%$ (HPLC), Fluka

Naringenin, 98%, Sigma

Natriumhydroxid-Plättchen zur Analyse, Merck

Natriumsulfat, wasserfrei, p.a., Merck

ortho-Phosphorsäure 85%, p.a., Merck

Pinocembrin, Sigma

Polyamid für die Säulenchromatographie, Roth

Quercetindihydrat, $\geq 99,0\%$ (HPLC), Fluka

Salzsäure, rauchend 37%, p.a., Merck

Stickstoff, verdichtet, Standardqualität (technisch), Air Liquide Austria GmbH

ASE-Filter, 30 mm Cellulose, Whatman, Dionex

Injektionsspritzen, B/Braun Inject 3 ml

Membranfilter, Sartolon 47 mm, 0,45 µm Polyamid, Sartorius Stedim

Spritzenfilter, 4 mm HPLC Syringe Filters, PTFE, 0,45 µm

Watte, ebelin cosmetic & more

Herstellung der Lösungen

5.1.1 Lösungen für die HPLC-CEAD

Flavonoidstandard-Lösungen	Je 4 mg der zu untersuchenden Flavonoide wurden in 10 mL Methanol im Ultraschallbad gelöst und die Lösungen in einem lichtundurchlässigen Gefäß verschlossen im Kühlschrank bei +4 bis +6°C aufbewahrt.
Flavonoidstandard-Mischung	Je 50 µL der 400 mg/L Urstandardlösung wurden in einen 20 mL Messkolben pipettiert und mit Methanol aufgefüllt. Diese 1 mg/L Mischung wurde 1 mal pro Woche frisch hergestellt.
1 M NaOH	Es wurden 4 g NaOH-Plätzchen in bidestilliertem Wasser gelöst und nach dem Abkühlen auf RT auf 100 mL mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.
0,2 M Phosphatpuffer	27,218 g Kaliumdihydrogenphosphat wurden in bidestilliertem Wasser gelöst, mit 2 mL <i>ortho</i> -Phosphorsäure 85% (zur Verbesserung der Haltbarkeit) versetzt und auf 1 L mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.
20 mM Phosphatpuffer	Es wurden 0,2 M KH_2PO_4 -Puffer mit bidestilliertem Wasser 1:9 verdünnt. Dieser Puffer wurde immer frisch hergestellt.

5.1.1.1 Laufmittelgemische:

Isokratische Elutionsmittel:

0,5% HAc in ACN/MeOH/H₂O
(5/20/75, v/v/v)

2,5 mL Essigsäure (HAc) wurden in einem 500 mL Messkolben mit 25 mL Acetonitril und 100 mL Methanol versetzt, bidest. Wasser bis knapp unter die Markierung zugegeben, mit 1 M NaOH auf pH 3 gebracht und mit bidest. Wasser aufgefüllt. Dann wurde das Laufmittel durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mind. 30 min im Ultraschallbad entgast.

MeOH/Puffer (50/50, v/v)

In einem 500 mL Messkolben wurden zu 250 mL Methanol 20 mM Phosphatpuffer bis knapp unter die Markierung zugegeben, mit *ortho*-Phosphorsäure der pH-Wert auf 3,2 eingestellt und mit Puffer aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mind. 30 min im Ultraschallbad entgast.

Gradientensystem 1:

0,5% HAc in H₂O

2,5 mL Essigsäure (HAc) wurden in einem 500 mL Messkolben mit bidest. Wasser, bis knapp unter die Markierung versetzt, mit 1 M NaOH auf pH 3 gebracht und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Dann wurde das Laufmittel durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mindestens 30 min im Ultraschallbad entgast.

0,5% HAc in MeOH

2,5 mL Essigsäure (HAc) wurden in einem 500 mL Messkolben mit Methanol bis knapp unter die Markierung versetzt, zur Pufferung 100 µL 1 M NaOH zugefügt (pH 3,73) und mit Methanol aufgefüllt. Dann wurde das Laufmittel durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mindestens 30 min im Ultraschallbad entgast.

Gradientensystem 2:

0,5% HAc in MeOH/ H₂O
(20/80, v/v)

2,5 mL Essigsäure (HAc) wurden in einem 500 mL Messkolben mit 100 mL Methanol versetzt, bidest. Wasser bis knapp unter die Markierung zugegeben, mit 1 M NaOH auf pH 3 gebracht und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Dann wurde das Laufmittel durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mindestens 30 min im Ultraschallbad entgast.

0,5% HAc in MeOH/ H₂O
(80/20, v/v)

2,5 mL Essigsäure (HAc) wurden in einem 500 mL Messkolben mit 400 mL Methanol versetzt, bidest. Wasser bis knapp unter die Markierung zugegeben, zur Pufferung 100 µL 1 M NaOH zugefügt (pH 3,54) und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Dann wurde das Laufmittel durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mindestens 30 min im Ultraschallbad entgast.

Gradientensystem 3:

MeOH/Puffer (20/80, v/v)

In einem 500 mL Messkolben wurden zu 100 mL Methanol 20 mM Phosphatpuffer bis knapp unter die Markierung zugegeben, mit *ortho*-Phosphorsäure der pH-Wert auf 3,2 eingestellt und mit Puffer aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mind. 30 min im Ultraschallbad entgast.

MeOH/Puffer (80/20, v/v)

In einem 500 mL Messkolben wurden zu 400 mL Methanol 20 mM Phosphatpuffer bis knapp unter die Markierung zugegeben, mit *ortho*-Phosphorsäure der pH-Wert auf 3,2 eingestellt und mit Puffer aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mind. 30 min im Ultraschallbad entgast.

Gradientensystem 4:

ACN/Puffer (20/80, v/v)

In einem 500 mL Messkolben wurden zu 100 mL Acetonitril 20 mM Phosphatpuffer bis knapp unter die Markierung zugegeben, mit *ortho*-Phosphorsäure der pH-Wert auf 3,2 eingestellt und mit Puffer aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mind. 30 min im Ultraschallbad entgast.

ACN/Puffer (80/20, v/v)

In einem 500 mL Messkolben wurden zu 400 mL Acetonitril 20 mM Phosphatpuffer bis knapp unter die Markierung zugegeben, mit *ortho*-Phosphorsäure der pH-Wert auf 3,2 eingestellt und mit Puffer aufgefüllt. Das Laufmittel wurde durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und mind. 30 min im Ultraschallbad entgast.

5.1.2 Lösungen für die Extraktion

Angesäuertes Wasser Bidestilliertes Wasser mit konz. Salzsäure auf pH 2 gebracht.

5.1.2.1 Methode 1: ASE-Extraktion

Extraktionsmittel 100% Essigsäureethylester
100 % Methanol
Essigsäureethylester/Methanol (70/30, v/v)
Methanol/Wasser (50/50, v/v)
Methanol/Wasser (80/20, v/v)
Ethanol/Wasser (80/20, v/v)

5.1.2.2 Methode 2: Extraktion mit Polyamid

Säulenmaterial Das trockene Material wurde in Methanol/angesäuertem (Essigsäure) Wasser (50/50, v/v) aufgeschlämmt und über Nacht stehen gelassen.

Elutionsmittel:

0,25% NH₃ in Methanol 5 mL Ammoniaklösung (25%) mit Methanol auf 500 mL aufgefüllt

0,5% NH₃ in Methanol 10 mL Ammoniaklösung (25%) mit Methanol auf 500 mL aufgefüllt.

2% NH₃ in Methanol 40 mL Ammoniaklösung mit (25%) Methanol auf 500 mL aufgefüllt.

5.1.2.3 Methode 3: Extraktion über Amberlite XAD-2-Harz

Säulenmaterial	Das trockene Harz wurde mit Methanol versetzt, bis das Lösungsmittel 2-2,5 cm überstand, danach wurde die Mischung etwa 1 min mit dem Magnetrührer gerührt und anschließend 15 min stehen gelassen. Dann wurde das Methanol so gut wie möglich abdekantiert, durch bidestilliertes Wasser ersetzt, wieder kurz durchgerührt und 10 min stehen gelassen. Danach wurde das Wasser abdekantiert und durch angesäuertes Wasser ersetzt, wieder durchgerührt und vor dem Verwenden des Harzes mindestens 10 min stehen gelassen.
----------------	---

5.1.3 Lösungen für die HPLC-MS

0,5% HAc in MeOH/ H ₂ O (20/80, v/v)	2,5 mL Essigsäure (HAc) wurden in einem 500 mL Messkolben mit 100 mL Methanol versetzt, bidest. Wasser bis knapp unter die Markierung zugegeben, mit 1 M NaOH auf pH 3 gebracht und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.
0,5% HAc in MeOH/ H ₂ O (80/20, v/v)	2,5 mL Essigsäure (HAc) wurden in einem 500 mL Messkolben mit 400 mL Methanol versetzt, bidest. Wasser bis knapp unter die Markierung zugegeben und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt (pH 3,21).

5.2 Liste der Honigproben

Honig	Farbe	Konsistenz	Jahr	Herkunft / Vertrieb
Ahorn	goldgelb	Creme (fest)	2008	Österreich / Imkerei Melissai, Markt Piesting
Akazie	goldgelb, klar	sehr flüssig	2006	Österreich / Burgenländische Naturheilmittel, Bruckneudorf
BioOrange	elfenbein	Creme	2006	Italien / Allos, Walter Lang GmbH Imkerhof, Deutschland
Buchweizen	goldbraun	Creme	2006	Österreich / Imkerei Melissai, Markt Piesting
Himbeere	gelb	Creme	2008	Österreich / Imkerei Melissai, Markt Piesting
Kirsche „Miele di ciliegio“	rotbraun, klar	flüssig	2007	Region Romagna / Apicoltura Brusi, Cervia, Italien
Kürbis	gelb	Creme	2006	Österreich / Franz Ramler, Prinzersdorf
Lavendel	goldbraun, trüb	flüssig	2007	Kroatien / Med Lavand
Löwenzahn „Miele di tarassaco“	dunkelgelb	Creme	2007	Region Romagna / Apicoltura Brusi, Cervia, Italien
Melone „Miele di melone“	hellgelb	Creme	2007	Region Romagna / Apicoltura Brusi, Cervia, Italien
Orange „Miele fior d'arancio“	gelb	Creme	2007	Cavallaro srl, Zafferana Etnea, Sizilien/ Auchan SpA, Rozzano, Italien
Phacelia	rotbraun, klar	sehr flüssig	2006	Österreich / Burgenländische Naturheilmittel, Bruckneudorf
Pinie	braun, trüb	flüssig	2007	Griechenland / Honig Kalloni
Raps	dunkelgelb	Creme	2007	Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland
Rhododendron „Miele di rododendro“	zart gelb, fast weiß	Creme	2007	Region Alta Montagna / Apicoltura Brusi, Cervia, Italien
Rosmarin „Miele di rosmarino“	dunkelgelb	Creme	2007	Region Sud Italia / Apicoltura Brusi, Cervia, Italien
Salbei	braun	flüssig		Kroatien
Thymian	braun	flüssig		Kreta, Griechenland
Zitrone „Miele fior di limone“	goldgelb	Creme	2007	Cavallaro srl, Zafferana Etnea, Sizilien/Auchan SpA, Rozzano, Italien

5.3 Verwendete Geräte

5.3.1 Allgemeine Laborausrüstung

Analysenwaage:	Mettler AT 400
Mikrowaage:	Sartorius Mikro M 3P
Pipetten:	Gilson Pipetman 200 µl, 1000 µl VWR 250 µL
Glassäulen	200 x 10 mm
Ultraschallbad:	Sonorex Super RK103H, Bandelin
pH-Meter:	Metrohm 691
Magnetrührer:	Ikamag Reo
Rotavapor:	R-114, Büchi
Wasserbad:	B-480, Büchi
ASE 100, Accelerated Solvent Extractor, Dionex	

5.3.2 HPLC-CEAD

L-6200 Intelligent Pump, Merck Hitachi
AS-2000A Autosampler, Merck Hitachi
Vorsäule: Phenomenex C18 (ODS, Octadecyl), 4 mm L x 3,0 mm ID
Trennsäule: Nucleodur Sphinx RP, EC 150 x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel
Säulenofen, Merck Hitachi
CoulArray-Detektor, Modell 5600
 Arbeitselektrode: poröser Graphit
 Referenzelektrode: Wasserstoff/Palladium
 Hilfselektrode: Platin
Auswertesoftware: CoulArrayWin, ESA

5.3.3 HPLC-MS

Agilent 1100 series HPLC-System (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA)

G1322A mobile Phase Vakuum Entgaser

G1312A binäre Pumpe

G1313A Autosampler

HCT-plus Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

Elektrospray Ionisation (ESI)

Stickstoffversorgung: Dominick Hunter – Nitrox – UHPLCMS 18 Kartuschen

Auswertesoftware: HyStar 3.1

Programm: Data Analysis Version 3.3 (Bruker Daltonics)

5.4 Entwicklung einer Methode zur Trennung und Detektion von Standardsubstanzen mittels HPLC-CEAD

Flavonoide sind elektrochemisch aktiv und eignen sich daher zur Detektion mittels eines elektrochemischen Elektroden-Array-Detektors.

Für alle HPLC-CEAD-Untersuchungen wurden die in Kapitel 5.3.2 aufgelisteten Geräte verwendet.

5.4.1 Isokratische Elution

Zur chromatographischen Trennung wurde von dem von Ferreres et al. [49] verwendeten Lösungsmittelsystem ausgegangen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor gearbeitet und deshalb die mobilen Phasen (siehe Tabelle 4) mit 1 M Natronlauge auf pH 3,5 eingestellt.

Es wurden verschiedene Laufmittelgemische (siehe Abschnitt 5.1.1.1 und Tabelle 4) hergestellt. Jeweils 15 µL der 1 mg/L Standardlösung wurden in das HPLC-System injiziert, mit dem jeweiligen Laufmittelgemisch bei 20°C eluiert und bei den Potentialen +100, +200, +300, +400, +500, +600, +700 und +800 mV mittels CEAD detektiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min, die Laufzeit 1 Stunde.

Tabelle 4: Zusammensetzung verschiedener Laufmittelgemische zur Ermittlung eines geeigneten Elutionsmittels

Laufmittel A	Laufmittel B	A	B
0,5% HAc in H ₂ O	0,5% HAc in MeOH	50%	50%
0,5% HAc in MeOH/H ₂ O (20/80, v/v)	0,5% HAc in MeOH/ H ₂ O (80/20, v/v)	50%	50%
0,5% HAc in ACN/MeOH/H ₂ O (5/20/75, v/v/v)		100%	
MeOH/Puffer (50/50, v/v)		100%	

5.4.2 Gradientenelution

Der in der Literatur [49] verwendete Gradient konnte nicht übernommen werden, weil in der vorliegenden Arbeit eine andere Säule (Nucleodur Sphinx RP, EC 150 x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) verwendet wurde.

Verschiedene Elutionsmittel und Gradienten wurden verwendet, um die Flavonoide zu trennen. Bei den folgenden Methoden wurde auf eine Flussrate von 1 mL/min bei 20°C eingestellt.

A) Elutionsmittel Methanol/Phosphatpuffer

Die Zusammensetzung der verwendeten Laufmittel ist in Tabelle 5 dargestellt:

Tabelle 5: Elutionsmittel zur Entwicklung einer Gradientenmethode

Laufmittel A	Methanol/Phosphatpuffer (20/80, v/v), pH 3,2
Laufmittel B	Methanol/Phosphatpuffer (80/20, v/v), pH 3,2

a) Linearer Gradient

A	B	Zeit
100%	0%	0 min
0%	100%	40 min

b) Stufenförmiger Gradient

A	B	Zeit
80%	20%	0 min
60%	40%	30 min
60%	40%	55 min
40%	60%	65 min
35%	65%	75 min
35%	65%	85 min
80%	20%	90 min
80%	20%	110 min

B) Elutionsmittel Acetonitril/Phosphatpuffer

Die Zusammensetzung der verwendeten Laufmittel ist in Tabelle 6 dargestellt:

Tabelle 6: Elutionsmittel zur Entwicklung einer alternativen Gradientenmethode

Laufmittel A	Acetonitril/Phosphatpuffer (20/80, v/v), pH 3,2
Laufmittel B	Acetonitril/Phosphatpuffer (80/20, v/v), pH 3,2

5.4.3 Strom-Spannungskurven

Zur Aufnahme der Strom-Spannungskurven der Standardsubstanzen wurden 15 µL einer Standardmischung der Konzentration 1 mg/L in das HPLC-System injiziert und bei den Potentialen +300, +400, +500, +650, +750 und +800 mV gemessen. Die Stromflüsse wurden gegen die jeweiligen Potentiale aufgetragen und durch Verbinden der Messpunkte die Strom-Spannungskurve erhalten.

5.4.4 Eichgeraden, Bestimmung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenzen

Es wurden Flavonoidstandard-Mischungen im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 2 mg/L mittels HPLC aufgetrennt und im CEAD bei den Potentialen von +300, +400, +500, +650, +750 und +800 mV detektiert.

Die Nachweisgrenze wurde bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von drei ermittelt. Dazu wurde im jeweiligen Bereich des Flavonoidpeaks und dem zur Auswertung verwendeten Kanal (siehe Tabelle 7) das Rauschen bestimmt und das dreifache Rauschsignal in die entsprechende Kalibriergerade eingesetzt und die Flavonidkonzentration berechnet.

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurde die zehnfache Höhe des Rauschsignals verwendet und analog zur Nachweisgrenze mittels entsprechender Kalibrierfunktion berechnet.

Tabelle 7: Zur Auswertung verwendeter Detektionskanal

Flavonoid	Myr	Qu	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal
Kanal (mV)	+300	+300	+800	+300	+500	+300	+300	+400

5.4.5 Linearer Bereich

Flavonoidstandard-Mischungen im Konzentrationsbereich von 0,01 mg/L bis 20 mg/L wurde mittels HPLC-CEAD gemessen. Die erhaltenen Peakhöhen wurden in die jeweilige Eichgerade eingesetzt und die Abweichung der errechneten Konzentration von der ins HPLC-System injizierten bestimmt.

5.4.6 Bestimmung der Reproduzierbarkeit

Die Intraday- sowie die Interday-Reproduzierbarkeit wurden für jedes Flavonoid in dessen optimalem Detektionskanal (siehe Tabelle 7) ermittelt.

Für die Ermittlung der Intraday-Reproduzierbarkeit wurde eine 1 mg/L Flavonoidstandard-Mischung fünf Mal hintereinander injiziert (Injektionsvolumen 15 µL) und die Signale der einzelnen Flavonoide ermittelt. Daraus wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung des Signals berechnet.

Für die Bestimmung der Interday-Reproduzierbarkeit wurde die 1 mg/L Flavonoidstandard-Mischung (Injektionsvolumen 15 µL) an fünf unabhängigen Tagen gemessen und Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung des Signals eines jeden Flavonoids berechnet.

5.5 Entwicklung einer Extraktionsmethode

5.5.1 Extraktion mittels ASE

Um die Flavonoide möglichst schnell und mit geringem Arbeitsaufwand aus Honig zu extrahieren, wurde versucht, eine Extraktionsmethode mittels ASE zu entwickeln.

Die zur Methodenentwicklung der ASE-Extraktion notwendigen HPLC-Analysen wurden mit der in Kapitel 5.6.1 dargestellten HPLC-CEAD-Methode ausgeführt.

5.5.1.1 Probenvorbereitung

Es wurden 5 g Honig mit 10 g Diatomeenerde homogenisiert und in eine 34 mL ASE-Zelle eingebracht. Die Zelle wurde verschlossen und in die Apparatur eingespannt.

5.5.1.2 Suche nach einem geeigneten Extraktionsmittel und der geeigneten Extraktionstemperatur

Um die Flavonoide aus Honig zu extrahieren, wurden verschiedene Lösungsmittel getestet. Alle Optimierungsversuche wurden mit demselben Orangenhonig im Dreifachansatz durchgeführt. Die Ausbeute der Methoden mit Essigsäureethylester bzw. Ethanol/Wasser (80/20, v/v) als Extraktionsmittel wurden mittels Standardaddition ermittelt. Die Veränderung der Ausbeute durch Ändern der Extraktionsbedingungen wurde auf das Ergebnis der Extraktion mit Ethanol/Wasser (80/20, v/v) bezogen.

Die Extraktionen wurden mit 100% Essigsäureethylester, 100% Methanol, Essigsäureethylester/Methanol (70/30, v/v), Methanol/Wasser (50/50, v/v), Methanol/Wasser (80/20, v/v) und Ethanol/Wasser (80/20, v/v) durchgeführt. Es wurden die in Tabelle 8 zusammengefassten Extraktionsparameter verwendet.

Tabelle 8: ASE-Parameter

Temperatur	100°C
Zyklusdauer	5 min
Zyklenzahl	2
Spülvolumen	50%
Spüldauer mit Stickstoff	90 sec

Weiters wurde mit Methanol auch bei 60°C, 80°C und 120°C und mit Esigsäureethylester/Methanol (70:30, v/v) auch bei 40°C, 60°C, 80°C und 120°C extrahiert.

5.5.1.3 Weiterverarbeitung der Extrakte

Die erhaltenen Extrakte wurden in einen 250 mL Spitzkolben transferiert und die ASE-Sammelflasche mit dem jeweils verwendeten Extraktionsmittel nachgespült und die Lösung dem ersten Extrakt hinzugefügt.

5.5.1.3.1 Extrakte mit wasserfreiem Extraktionsmittel

Der Extrakt wurde am Rotavapor bei einer Badtemperatur von 40°C bis zur Trockene abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 mL Methanol im Ultraschallbad gelöst. Dann wurde 1 mL 20 mM Phosphatpuffer zugegeben und nochmals 5 min beschallt. Die Lösung wurde mit einer Spritze aufgezogen und über einen Spritzenfilter abfiltriert. 1 mL der filtrierten Lösung wurde zur HPLC-CEAD-Analyse in ein HPLC-Vial transferiert.

5.5.1.3.2 Extrakte mit Wasser im Extraktionsmittel

Dem Extrakt wurde am Rotavapor bei einer Badtemperatur von 40°C das organische Lösungsmittel entzogen. Die zurückgebliebene Wasserphase wurde unter Nachspülen mit bidest. Wasser in einen Scheidetrichter überführt und 3 mal mit 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden 2 Stunden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Trocknungsmittel wurde abfiltriert und das Filtrat in einem

250 mL Kolben am Rotavapor zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 1 mL Methanol im Ultraschallbad gelöst. Dann wurde 1 mL 20 mM Phosphatpuffer zugegeben und nochmals 5 min beschallt. Die Lösung wurde mit einer Spritze aufgezogen und über einen Spritzenfilter abfiltriert. 1 mL der filtrierten Lösung wurde zur HPLC-CEAD-Analyse in ein HPLC-Vial transferiert.

5.5.1.4 Ermittlung der Extraktionsausbeute

Um die Wiederfindung der Flavonoide zu bestimmen, wurde eine Standardaddition durchgeführt, mit den „Spike-levels“ von 0%, 50%, 100% und 150% der mittels der Kalibriergerade errechneten Flavonoidkonzentrationen (siehe Abschnitt 5.6.2).

5.5.2 Extraktion mittels Polyamid

Das in verdünnter Essigsäure aufgeschlammte Säulenmaterial wurde in Glassäulen gefüllt und vor dem Auftragen der Probe erst mit 25 mL des jeweiligen Elutionsmittels, dann mit 25 mL angesäuertem Wasser konditioniert.

Die zur Methodenentwicklung der Extraktion notwendigen HPLC-Analysen wurden mit der in Kapitel 5.6.1 dargestellten HPLC-CEAD-Methode ausgeführt.

5.5.2.1 Extraktion von Honigproben

Es wurden 5 g Honig in 25 mL angesäuertem Wasser (pH 2 mit HCl) 15 min im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde auf den Säulenkopf aufgebracht und mit 50 mL angesäuertem Wasser gewaschen. Die phenolischen Verbindungen wurden anschließend mit 50 mL Methanol mit etwa 1 Tropfen pro min in einen 250 mL Spitzkolben eluiert.

5.5.2.2 Weiterverarbeitung der Extrakte

Der Extrakt wurde am Rotavapor bei einer Badtemperatur von 40°C bis zur Trockene abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 mL Methanol im Ultraschallbad gelöst. Dann wurde 1 mL 20 mM Phosphatpuffer zugegeben und nochmals 5 min beschallt. Die Lösung wurde mit einer Spritze aufgezogen und über einen Spritzenfilter filtriert. 1 mL der filtrierten Lösung wurde zur HPLC-CEAD-Analyse in ein HPLC-Vial transferiert.

5.5.2.3 Ermittlung der Extraktionsausbeute

Um die Wiederfindung der Flavonoide zu bestimmen, wurde eine Standardaddition durchgeführt, mit den „Spike-levels“ von 0%, 50%, 100% und 150% der mittels der Kalibriergerade errechneten Flavonoidkonzentrationen (siehe Abschnitt 5.6.2).

5.5.2.4 Extraktion einer Flavonoidstandard-Mischung

Die meisten Flavonoide des Honigs konnten gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen wieder gefunden werden. Deshalb wurde die Extraktion mit Standardsubstanzen durchgeführt und dabei verschiedene Elutionsmittel getestet.

1 mL einer Mischung aus allen Standardsubstanzen mit einer Konzentration von 2 mg/L wurde auf die Säule aufgebracht. Die Elution der phenolischen Fraktion wurde mit 100% Methanol, 0,25% NH₃ in Methanol, 0,5% NH₃ in Methanol und 2% NH₃ in Methanol durchgeführt.

Elution und Weiterverarbeitung wurden, wie in Kapitel 5.5.2.1/2 beschrieben, durchgeführt.

Durch den Vergleich mit der unbehandelten Standardmischung, die ebenfalls mit HPLC-CEAD gemessen wurde, wurde die Wiederfindung der Flavonoide untersucht.

5.5.2.4.1 Methoden zur Entfernung des Lösungsmittels

Es wurde angenommen, dass das Milieu beim Abrotieren zu alkalisch wird, und daher die Flavonoide zerstört werden. Darum wurde eine Standardmischung in 100% Methanol, 0,25 % Ammoniak in Methanol bzw. 0,5% Ammoniak in Methanol aufgenommen und dann wie in Kapitel 5.5.2.2 verfahren.

Es wurde versucht, den Ammoniak durch Zugabe von Essigsäure bis zu einem pH-Wert von 6,5 zu neutralisieren und dann wieder wie in Kapitel 5.5.2.2 zu verfahren.

Weiters wurde das Lösungsmittel (0,5% NH₃ in Methanol) durch Ausblasen mit Stickstoff entfernt.

5.5.3 Extraktion mittels Amberlite XAD-2-Harz

5.5.3.1 Extraktion

Es wurden 5 g Honig in 25 mL angesäuertem Wasser (pH 2 mit HCl) durch 15 min Rühren mit einem Magnetrührer gelöst. Die Lösung wurde über Watte zu etwa 10 g konditioniertem Amberlite XAD-2-Harz filtriert, die Mischung wurde 30 min gerührt und anschließend in Glassäulen gefüllt. Die Homogenisierung der Honigprobe mit Wasser mit saurem pH-Wert führt zu einer Hydrolyse eventuell vorhandener Flavonoidglykoside, die weniger polaren Aglykone werden besser an das Harz adsorbiert [51]. Die Säulen wurden mit 40 mL angesäuertem Wasser und 60 mL bidest. Wasser gewaschen, um Zucker und andere polare Substanzen zu entfernen. Dann wurden die phenolischen Verbindungen mit 50 mL Methanol in einen 250 mL Spitzkolben eluiert (nach [49]).

5.5.3.2 Weiterverarbeitung der Extrakte

Das Eluat wurde am Rotavapor bei einer Badtemperatur von 40°C zur Trockene eingedampft, der Rückstand im Ultraschallbad in 5 mL bidest. Wasser aufgenommen und in einen Scheidetrichter überführt. Die Wasserphase wurde 3 mal mit 5 mL Diethylether extrahiert, die vereinigten Etherphasen über Na₂SO₄ eine Stunde getrocknet und anschließend im Rotavapor bei 40°C zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 1 mL Methanol im Ultraschallbad gelöst. Dann wurde 1 mL 20 mM Phosphatpuffer zugegeben und nochmals 5 min beschallt. Die Lösung wurde mit einer Spritze aufgezogen und über einen Spritzenfilter filtriert. 1 mL der filtrierten Lösung wurde zur HPLC-CEAD-Analyse in ein HPLC-Vial transferiert.

5.5.3.3 Ermittlung der Extraktionsausbeute

Die Wiederfindung der Flavonoide wurde mittels einer Standardaddition bestimmt, wobei 0%, 50%, 100% und 150% der über die Kalibrierfunktion errechneten Flavonoidkonzentrationen zugesetzt wurden (siehe Abschnitt 5.6.2).

5.6 Entwicklung einer Methode zur Trennung und Detektion von Flavonoiden in Honig mittels HPLC-CEAD

5.6.1 Anpassung der Gradientenelution

Die Gradientenmethode, die für die Auftrennung der Standardsubstanzen entwickelt wurde, konnte das komplexe Spektrum an den Substanzen in den Honigproben nicht hinreichend auftrennen. Daher musste für die Realproben ein neuer Gradient entwickelt werden. Die experimentellen Parameter sind untenstehend zusammengefasst:

A	B	Zeit
100%	0%	0 min
60%	40%	40 min
60%	40%	65 min
30%	70%	70 min
30%	70%	85 min
20%	80%	100 min
100%	0%	102 min
100%	0%	120 min

Laufmittel A: Methanol/Phosphatpuffer (20/80, v/v), pH 3,2

Laufmittel B: Methanol/Phosphatpuffer (80/20, v/v), pH 3,2

Flussrate: 1 mL/min

Säulentemperatur: 20°C

Injektionsvolumen: 15 µL

Potentiale: +300, +400, +500, +650, +750, +800, +200¹, +100¹ mV

5.6.2 Wiederfindung mittels Standardaddition

Die Ausbeute wurde mittels Standardaddition bestimmt. Dazu wurde zuerst die Honigprobe extrahiert, mittels HPLC-CEAD vermessen und die Konzentrationen der

¹ Diese Potentiale wurden ausgewählt, weil die letzten Zellen sehr hohe Grundströme zeigten

Flavonoide über Eichgeraden errechnet. Es wurde eine Flavonoidstandard-Mischung hergestellt, die die errechneten Flavonoidkonzentrationen in 1 mL enthält. Von dieser Standardmischung wurden den Honigproben 0,5 mL (50 %), 1 mL (100 %) bzw. 1,5 mL (150%) zugesetzt. Die drei gespikten Honigproben wurden ebenso wie eine ungespikte Probe aufgearbeitet und mittels HPLC-CEAD analysiert. In einem Diagramm wurde die Peakhöhe gegen die zugesetzte Konzentration der Flavonoide aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die Messpunkte gelegt. Durch Vergleich der Steigung der Standardadditionsgerade mit einer ebenfalls gemessenen Kalibrierfunktion wurde die Ausbeute bestimmt.

5.6.2.1 Einfluss der Konsistenz auf die Wiederfindung

Um den Einfluss der unterschiedlichen Konsistenz der Honige auf die Ausbeute zu untersuchen, wurde bei einem flüssigen Honig (Salbei) und einem Honig von cremiger Konsistenz (BioOrange) jeweils fünf Mal eine Standardaddition durchgeführt und Mittelwert, absolute und relative Standardabweichung bestimmt.

5.6.3 Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenzen der Flavonoide in Honigproben wurden über das dreifache Rauschen der Basislinie ermittelt. Dazu wurde im jeweiligen zur Auswertung verwendeten Kanal (siehe Abschnitt 5.4.4, Tabelle 7) im Bereich des jeweiligen Flavonoidpeaks in einer Bio-Orangenhonigprobe das Rauschen bestimmt und die dreifache Rauschsignal über die Kalibrierfunktion (Abbildung 31) in die Konzentration an Flavonoid umgerechnet.

Die Bestimmungsgrenze wurde durch das Einsetzen der zehnfachen Höhe des Rauschens in die Kalibrierfunktion errechnet.

5.7 Qualitative Untersuchung der Honigproben mittels HPLC-MS

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden einige Honige zusätzlich qualitativ mit HPLC-MS untersucht.

Es wurden dieselbe Säule (Nucleodur Sphinx RP, EC 150 x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) und die gleichen Parameter wie bei der HPLC-CEAD-Methode verwendet (siehe Kapitel 5.6.1). Da die Salze eines Puffers die Ionisation mittels ESI stören, wurde auf Laufmittelgemische ohne Phosphatpuffer zurückgegriffen (Abschnitt 5.1.3). Bei der von mir verwendeten Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min würde zu viel Eluat in die Ionisationsquelle gelangen, deshalb wurde nach der Trennsäule ein T-Stück eingefügt, durch das etwa die Hälfte des Eluats abgeleitet wurde. Das genaue Volumen des in das MS gelangenden Eluats war nicht von Bedeutung, da eine qualitative Analyse durchgeführt wurde.

Die Detektion erfolgte mittels Massenspektrometer bei den in Tabelle 9 angeführten Parametern. Unter diesen Bedingungen entstehen hauptsächlich Molekülionen, an Hand derer, und mit Hilfe der Retentionszeiten, die Flavonoide identifiziert wurden.

Tabelle 9: MS-Parameter

	positiver Modus	negativer Modus
Kapillarspannung	-4,5 kV	+4,5 kV
Druck des Zerstäubers	40 psi	40 psi
Gasflussrate	10 L/min	10 L/min
Gastemperatur	300°C	300°C
Skimmerpotential	55 V	-40V
Kapillarausgangspotential	200 V	-170 V
Trap Drive	38	38
Scan-Bereich	100 – 400 m/z	100 – 400 m/z

Zu Beginn wurde ein 1 mg/L Flavonoid-Standardgemisch einmal im positiven und einmal im negativen Modus gemessen, um die besser geeignete Methode herauszufinden. Da sich das Massenspektrometer nicht wie der elektrochemische Detektor bei der Rückkehr auf die Anfangsbedingungen wieder äquilibrieren muss, kann der Lauf nach 85 min beendet werden.

Experimentelle Parameter:

Laufmittel A: 0,5% HAc in MeOH/H₂O (20/80, v/v)

Laufmittel B: 0,5% HAc in MeOH/H₂O (80/20, v/v)

Flussrate: 1 mL/min

Injektionsvolumen: 15 µL

Gradientenprogramm:

A	B	Zeit
80%	20%	0 min
60%	40%	30 min
60%	40%	55 min
40%	60%	65 min
35%	65%	75 min
35%	65%	85 min

6 ERGEBNISSE

6.1 Entwicklung einer Methode zur Trennung und Detektion von Flavonoiden in Standardlösungen mittels HPLC-CEAD

6.1.1 Chromatographische Trennung

Mittels isokratischer Elution (siehe Kapitel 5.4.1) konnte keine ausreichende Auftrennung der Standardsubstanzen erreicht werden, deshalb wurde nach einer geeigneten Gradientenmethode gesucht. Ausgegangen wurde von einem linearen Gradienten, damit die Lage der Substanzpeaks abgeschätzt werden konnte. Dann wurde der Gradient so verändert, dass die Peaks möglichst gut in möglichst kurzer Messzeit aufgetrennt wurden (Details siehe Kapitel 5.4.2).

In Abbildung 29 ist ein Chromatogramm einer mit der entwickelten Gradientenmethode (siehe Abschnitt 6.1.6) aufgetrennten Flavonoid-Standardmischung dargestellt.

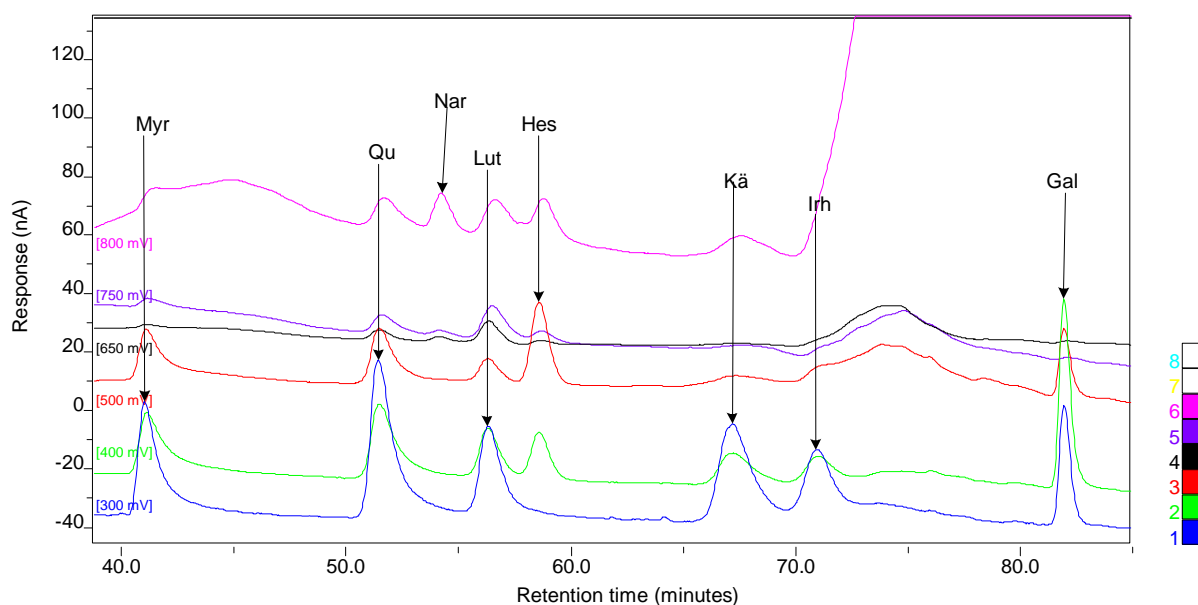


Abbildung 29: CEAD-Chromatogramm einer Flavonoid-Standardmischung aus Myricetin (Myr), Quercetin (Qu), Naringenin (Nar), Luteolin (Lut), Hesperetin (Hes), Kämpferol (Kä), Isorhamnetin (Irh) und Galangin (Gal). Die Konzentration der Flavonoide betrug je 1 mg/L.

Um die Messzeit zu verkürzen und den Verbrauch an organischem Lösungsmittel zu verringern, wurde Methanol durch das stärker eluierende Acetonitril ersetzt.

Eine ausreichende Auftrennung der Standardsubstanzen konnte mit Acetonitril als organische Komponente des Laufmittelgemisches nicht erreicht werden, daher wurde die zuvor mit Methanol entwickelte Gradientenmethode zur weiteren Analyse verwendet.

Die Basislinie stieg bei den hohen Potentialen (750 und 800 mV) bei hohen Methanolkonzentrationen sehr stark an, deshalb konnten die Peaks von Apigenin, Pinocembrin, Chrysin und Acacetin nicht quantitativ ausgewertet werden. Naringenin konnte hingegen bei niedriger Methanolkonzentration bestimmt werden.

Isorhamnetin und Apigenin konnten nicht aufgetrennt werden, darum konnte Apigenin nur in Abwesenheit von Isorhamnetin bestimmt werden

6.1.2 Coulometrische Elektroden-Array-Detektion

Bei einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor kann zusätzlich zur Retentionszeit auch die Strom-Spannungskurve (Abbildung 30) zur Identifizierung einer Verbindung herangezogen werden.

Aus Abbildung 30 geht hervor, dass die Detektorantwort bei Myricetin, Quercetin, Luteolin, Kämpferol und Isorhamnetin bei +300 mV, bei Naringenin bei +800 mV, bei Hesperetin bei +500 mV und bei Galangin bei +400 mV am stärksten ist. Daher wurden diese Kanäle zur Auswertung der Chromatogramme, zur Erstellung der Kalibrierfunktionen und zur Ermittlung von Wiederfindung, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und Reproduzierbarkeit ausgewählt.

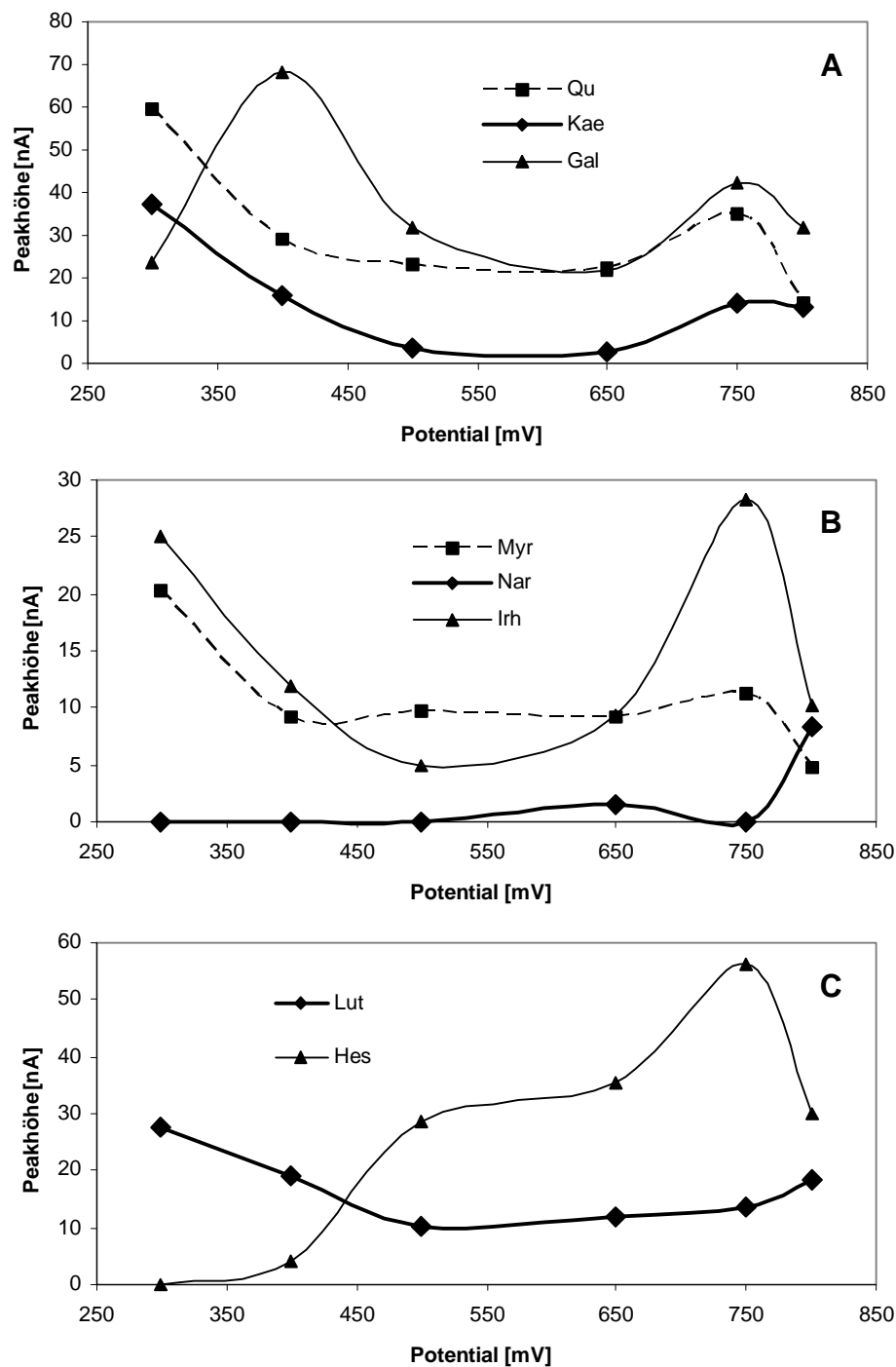


Abbildung 30: Strom-Spannungskurven einer Standardlösung (1 mg/L) (A) von Quercetin (Qu), Kämpferol (Kae) und Galangin (Gal); (B) von Myricetin (Myr), Naringenin (Nar) und Isorhamnetin (Irh) und (C) von Luteolin (Lut) und Hesperetin (Hes)

6.1.3 Kalibrierfunktion, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Es wurden Flavonoidstandard-Mischungen im Konzentrationsbereich von 0.01 bis 2 mg/L mittels HPLC-CEAD analysiert und zur Erstellung der Kalibrierfunktionen (Abbildung 31) die gemessenen Peakhöhen gegen die Flavonoidkonzentrationen aufgetragen.

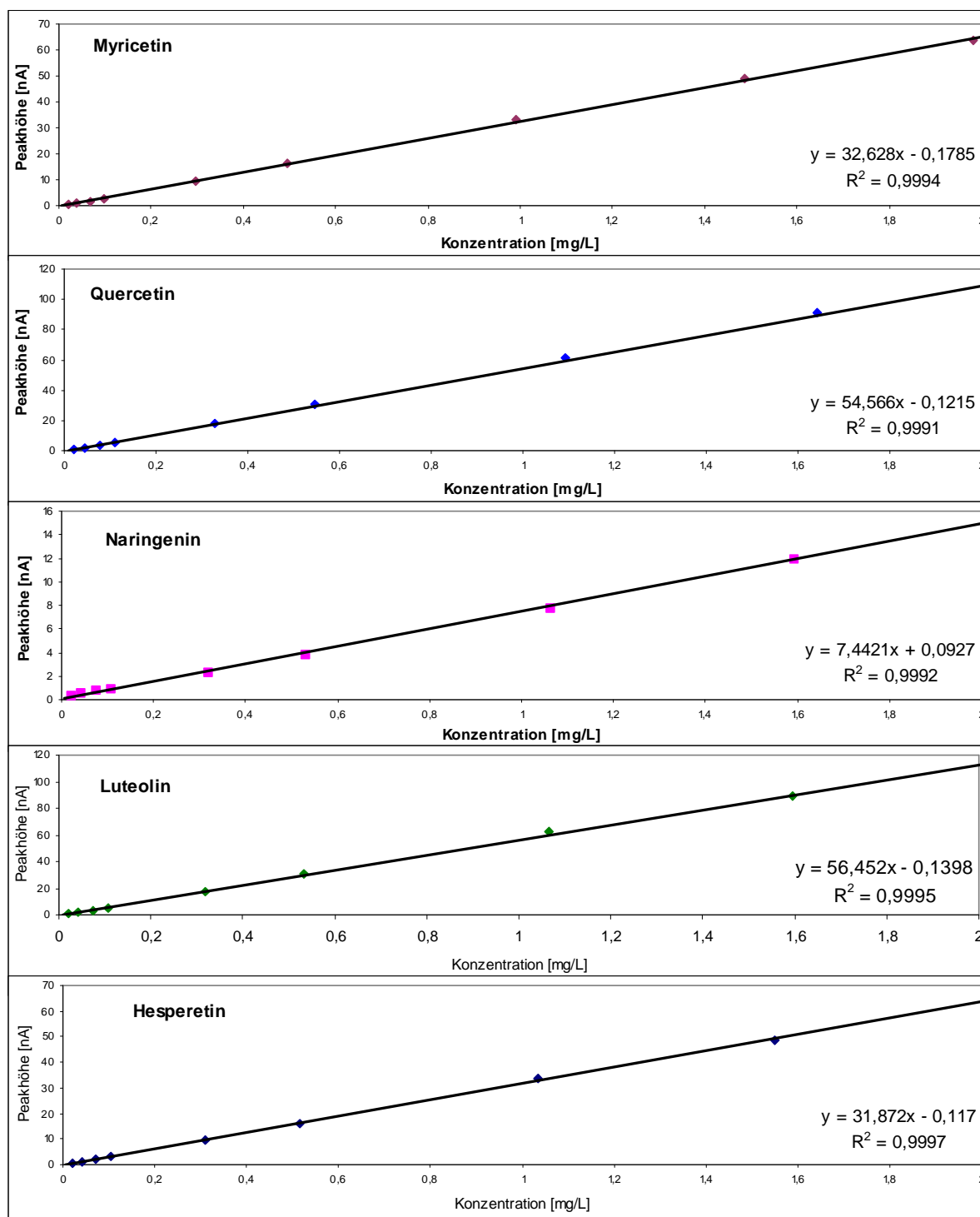


Abbildung 31: Kalibrierfunktionen der Flavonoid-Standardmischungen (c=0,01-2 mg/L)

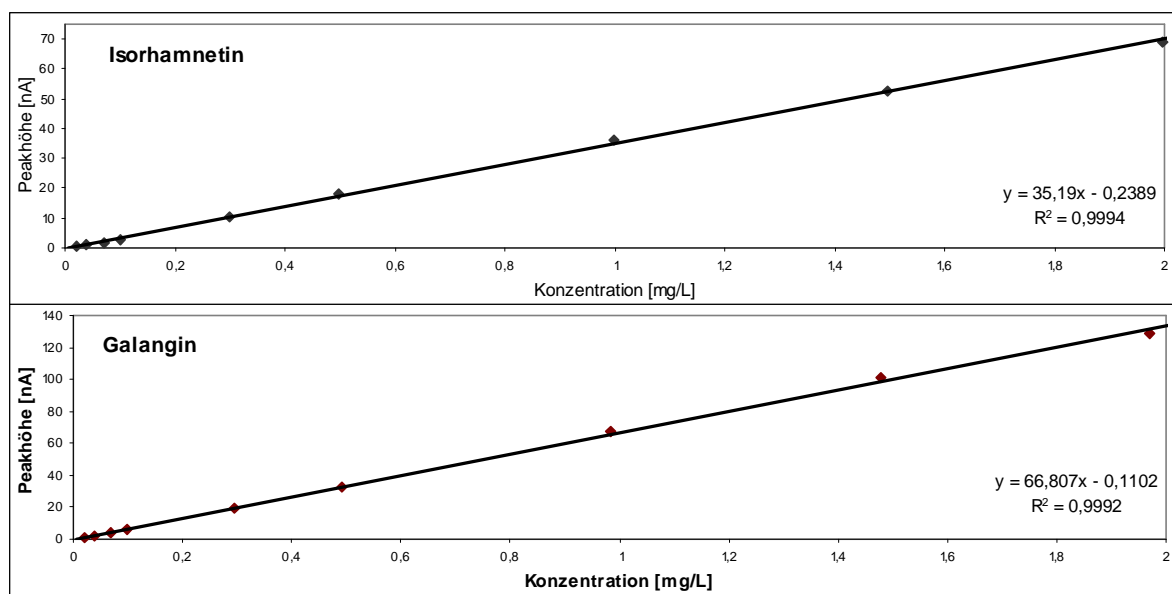


Abbildung 31 (Fortsetzung): Kalibrierfunktionen der Flavonoid-Standardmischungen (c=0,01-2 mg/L)

Für den Kanal +300 mV betrug das Rauschen 0,131 nA, für +400 mV 0,041 nA, für +500 mV 0,034 nA und für +800 mV 0,039 nA.

Die Nachweisgrenze wurde rechnerisch über das Einsetzen des Signals des dreifachen Rauschens (S/N=3) (0,392 nA, 0,122 nA, 0,101 nA bzw. 0,116 nA) in die Eichfunktionen (Abbildung 31) ermittelt. Die experimentelle Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte durch Messen niedrig konzentrierter Standardlösungen. Wie in Tabelle 10 ersichtlich lagen die experimentell bestimmten Nachweisgrenzen immer im Bereich der rechnerisch ermittelten.

Für die Bestimmung der Erfassungsgrenze wurde die zehnfache Höhe des Rauschsignals (S/N=10) (1,305 nA, 0,407 nA, 0,337 nA bzw. 0,385 nA) in die Kalibrierfunktionen eingesetzt.

Tabelle 10: Rechnerisch und experimentell bestimmte Nachweisgrenzen der einzelnen Flavonoide

RECHNERISCH								
Flavonoid	Myr	Qu	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal
S/N 3 (µg/L)	17	9	3	9	7	13	18	4
S/N 10 (µg/L)	45	26	39	26	14	36	44	7
EXPERIMENTELL								
Flavonoid	Myr	Qu	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal
Peakhöhe (nA)	0,491	0,423	0,239	0,427	0,202	0,680	0,466	0,559
S/N 3 (µg/L)	20	10	20	10	10	20	20	10

6.1.4 Linearer Bereich

Im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,01 bis 20 mg/L wurde bei den meisten der untersuchten Flavonoide ein linearer Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und Detektorsignal festgestellt. Bei Hesperetin endete der lineare Bereich bei 5 mg/L, bei Isorhamnetin bei 15 mg/L und bei Galangin bei 10 mg/L.

6.1.5 Reproduzierbarkeit

Zur Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung und relativen Standardabweichung der Peakhöhen wurden die nachfolgenden Formeln aus [85] verwendet.

Mittelwert:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Standardabweichung
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

relative Standardabweichung
$$RSD[\%] = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Die Ergebnisse der Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Methode bestimmt durch wiederholte Messung von Flavonoid-Standardlösungen, sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Intraday- und Interday-Reproduzierbarkeit einer Standardmischung

		Intraday	Interday
	Mittelwert (Peakhöhe)	RSD[%]	RSD[%]
Myr	39,64	2,33	6,60
Quer	54,88	2,86	4,78
Nar	13,72	4,32	7,28
Lut	32,84	3,23	3,86
Hes	28,92	1,85	4,06
Kä	34,12	2,55	4,64
Irh	23,84	3,52	4,64
Gal	64,14	2,32	4,58

6.1.6 Zusammenfassung der experimentellen Daten und Ergebnisse

Abschließend sind die experimentellen Parameter der Trennung und Detektion, die optimalen Detektionskanäle, die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Flavonoide und die Reproduzierbarkeit der Messungen zusammengefasst.

6.1.6.1 Trennung und Detektion

Laufmittel A: Methanol/Phosphatpuffer (20/80, v/v), pH 3,2

Laufmittel B: Methanol/Phosphatpuffer (80/20, v/v), pH 3,2

Flussrate: 1 mL/min

Säulentemperatur: 20°C

Injektionsvolumen: 15 µL

Gradientenprogramm:

A	B	Zeit
80%	20%	0 min
60%	40%	30 min
60%	40%	55 min
40%	60%	65 min
35%	65%	75 min
35%	65%	85 min
80%	20%	90 min
80%	20%	110 min

Detektorpotentiale: +300, +400, +500, +650, +750, +800, +200², +100¹ mV

² Diese Potentiale wurden ausgewählt, weil die letzten Zellen sehr hohe Grundströme zeigten

6.1.6.2 Optimaler Detektionskanal, Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Reproduzierbarkeit

Tabelle 12: Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

	optimaler Detektions- kanal	Nachweis- grenze rechnerisch	Nachweis- grenze experimentell	Bestimmungs- grenze	Reproduzier- barkeit Intraday	Reproduzier- barkeit Interday
Myricetin	+300 mV	17 µg/L	20 µg/L	45 µg/L	2,3%	6,6%
Quercetin	+300 mV	9 µg/L	10 µg/L	26 µg/L	2,9%	4,8%
Naringenin	+800 mV	3 µg/L	20 µg/L	39 µg/L	4,3%	7,3%
Luteolin	+300 mV	9 µg/L	10 µg/L	26 µg/L	3,2%	3,9%
Hesperetin	+500 mV	7 µg/L	10 µg/L	14 µg/L	1,9%	4,1%
Kämpferol	+300 mV	13 µg/L	20 µg/L	36 µg/L	2,5%	4,6%
Isorhamnetin	+300 mV	18 µg/L	20 µg/L	44 µg/L	3,5%	4,6%
Galangin	+400 mV	4 µg/L	10 µg/L	7 µg/L	2,3%	4,6%

6.2 Entwicklung einer Extraktionsmethode

Ein wesentlicher Schritt einer Analysenmethode ist die Aufarbeitung der Probe, bei der aus der Matrix die zu bestimmenden Komponenten weitgehend matrixfrei angereichert werden sollen. Für Honig bieten sich verschiedene Extraktionsmethoden an.

6.2.1 Extraktion mittels ASE

Bei allen methanolhaltigen Lösungsmitteln (experimentelle Bedingungen siehe Kapitel 5.5.1) wurden relativ große Mengen an Zuckern mitextrahiert, was die weitere Aufarbeitung erschwerte oder teilweise sogar unmöglich machte. Ähnliche Probleme traten auch auf, als Methanol bei verschiedenen Temperaturen (60, 80, 100, 120°C) verwendet wurde.

Bei der Extraktion mit Essigsäureethylester/Methanol (70:30, v/v) wurde versucht, die Ausbeute durch Verändern der Extraktionstemperatur zu verbessern. Bei 40°C, 60°C und 80°C wurden zwar eine kleinere Menge an Zuckern mitextrahiert, aber auch die Ausbeuten waren geringer. Bei 120°C wurden so große Mengen an Zuckern gelöst, dass ein Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor unmöglich machte.

Daher wurden die Ausbeuten nur für Essigsäureethylester und Ethanol/Wasser (80/20, v/v) ermittelt. Die Bestimmung erfolgte mittels Standardaddition und die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Wiederfindung der Flavonoide in Bio-Orangenhonig nach Extraktion mittels ASE

Extraktionsmittel	Wiederfindung in %						
	QU	NAR	LUT	HES	KÄ	IRH	GAL
Essigsäureethylester	82,5	87,6	89,1	90,2	89,4	97,9	99,9
Ethanol/Wasser (80/20 v/v)	84,5	98,0	92,9	101,8	90,0	94,4	95,9

Da die Ausbeuten zum Teil unter 85% lagen, wurde als nächstes die Anwendbarkeit anderer Extraktionsmethoden geprüft.

6.2.2 Extraktion mittels Polyamid

Der wässrige Probenextrakt wurde auf eine Polyamidsäule aufgebracht und die adsorbierten Flavonoide mit Methanol eluiert. Die Ausbeuten der einzelnen Flavonoide in einer Bio-Orangenprobe sind in Tabelle 14 dargestellt. Sie wurden mittels Standardaddition ermittelt.

Tabelle 14: Wiederfindung der Flavonoide in Bio-Orangenhonig nach Extraktion mittels Polyamid

Flavonoid	QU	NAR	LUT	HES	KÄ	IRH	GAL
Wiederfindung in %	50,4	70,1	62,8	81,2	33,1	52,2	69,9

Um den Grund für die geringen Ausbeuten abzuklären wurde eine Flavonoidstandard-Mischung auf die gleiche Weise wie die Honigproben aufgearbeitet. Dabei zeigte sich, dass nur ein Teil der Flavonoide mit Methanol aus der Säule eluiert werden konnte. Deshalb wurde durch Zumischung von Ammoniak zum Methanol (0,25%, 0,5% bzw. 2%) versucht die Elutionskraft zu erhöhen. Der Vergleich mit einer nicht aufgearbeiteten Standardmischung zeigte, dass auch hier Flavonoid verloren ging.

Um die Ursache für die Verluste zu klären wurde die Flavonoidstandard-Mischung mit verschiedenen Elutionsmitteln versetzt und die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Nur bei Verwendung von reinem Methanol konnten sämtliche Flavonoide detektiert werden.

Bei Verwendung von 0,5% Ammoniak in Methanol traten selbst bei vorsichtiger Entfernung des Lösungsmittels im Stickstoffstrom Verluste an Flavonoiden auf.

Es wurde angenommen, dass die Flavonoide beim vorherrschenden alkalischen pH-Wert teilweise zersetzt werden. Daher wurde Ammoniak durch Zugabe von Essigsäure bis zu einem pH-Wert von 6,5 neutralisiert. Auch hier konnten die Standardsubstanzen nicht in ausreichender Menge wiedergefunden werden.

Aufgrund der großen Verluste an Flavonoiden bei diesem Aufarbeitungsschritt wurde auf die Verwendung von Polyamid verzichtet.

6.2.3 Extraktion mittels Amberlite XAD-2-Harz

Die Extraktion wurde mit der in [52] beschriebenen Methode durchgeführt (Details siehe Kapitel 5.5.3).

Nach [50] muss man das Eluat zuerst zur Trockene dampfen, dann in Wasser aufnehmen und dieses dann mit Ether extrahieren, um störende farbige Substanzen und Zuckerreste zu entfernen. Da in dieser Arbeit ein elektrochemischer Detektor und nicht ein UV-/DAD-Detektor wie in [50] verwendet wurde, wurde untersucht, ob der zweite Extraktionsschritt notwendig ist, oder weggelassen werden kann. Die Extraktion mit Diethylether brachte keine Verbesserung bei der Detektion, sondern war mit Verlusten an Flavonoiden verbunden. Daher wurde auf diesen Schritt verzichtet.

Die Extraktion mittels Amberlite XAD-2 erwies sich als effektivste der erprobten Methoden, daher wurde sie zur Aufarbeitung aller Honigproben verwendet. Die Ausbeuten der einzelnen Flavonoide sind in Abschnitt 6.3.3 in Tabelle 15 zusammengefasst.

In Abbildung 32 ist schematisch der Ablauf der Analysenmethode dargestellt.

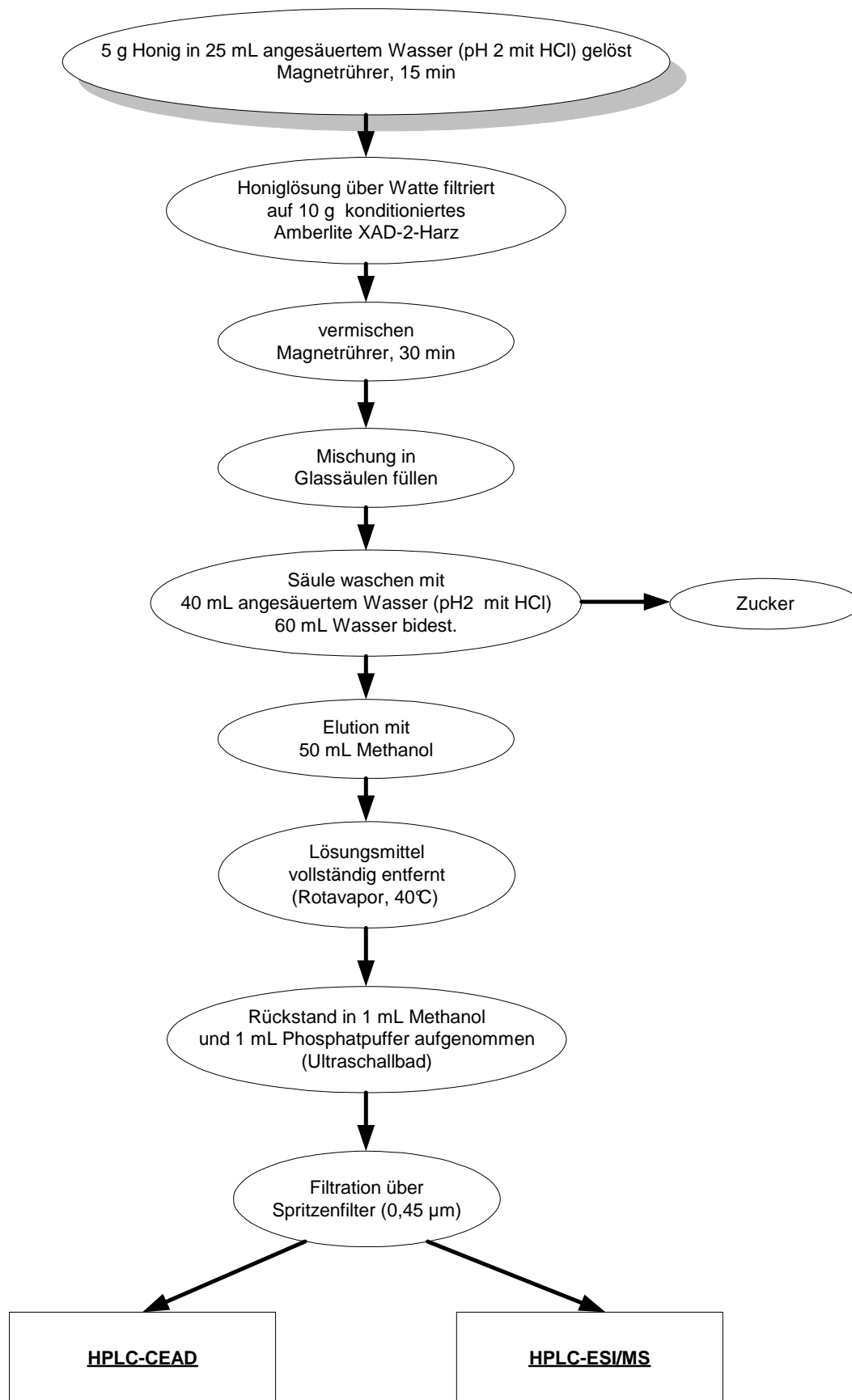


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Analysenmethode

6.3 Entwicklung einer Methode zur Trennung und Detektion von Flavonoiden in Honig mittels HPLC-CEAD

Üblicherweise muss man für reale Proben die Trennbedingungen im Vergleich zu den für Standardmischungen geeigneten abändern, da in der Probe eine große Zahl von Verunreinigungen verschiedener Polarität vorkommen, die die Detektion der zu untersuchenden Verbindungen stören.

6.3.1 Optimierung des Gradientenprogramms für Realproben

Da mit der Gradientenmethode, die zur Auftrennung der Flavonoidstandards entwickelt wurde, das komplexe Honigspektrum nicht hinreichend aufgetrennt werden konnte, musste für die Realproben ein neuer Gradient entwickelt werden. Die beste Auftrennung der Honigprobe wurde mit nachfolgendem Gradienten erreicht.

A	B	Zeit
100%	0%	0 min
60%	40%	40 min
60%	40%	65 min
30%	70%	70 min
30%	70%	85 min
20%	80%	100 min
100%	0%	102 min
100%	0%	120 min

Die anderen Analysenbedingungen wurden von der Untersuchung der Standardsubstanzen übernommen:

Laufmittel A: Methanol/Phosphatpuffer (20/80, v/v), pH 3,2

Laufmittel B: Methanol/Phosphatpuffer (80/20, v/v), pH 3,2

Flussrate: 1 mL/min

Säulentemperatur: 20°C

Injektionsvolumen: 15 µL

Potentiale: +300, +400, +500, +650, +750, +800, +200, +100 mV

Auswertung bei +300 mV: Myricetin, Quercetin, Luteolin, Kämpferol und Isorhamnetin

Auswertung bei +400 mV: Galangin

Auswertung bei +500 mV: Hesperetin

Abwertung bei +800 mV: Naringenin

In Abbildung 36 ist das Chromatogramm einer mit dem entwickelten Gradienten getrennten Bio-Orangenhonig-Probe dargestellt.

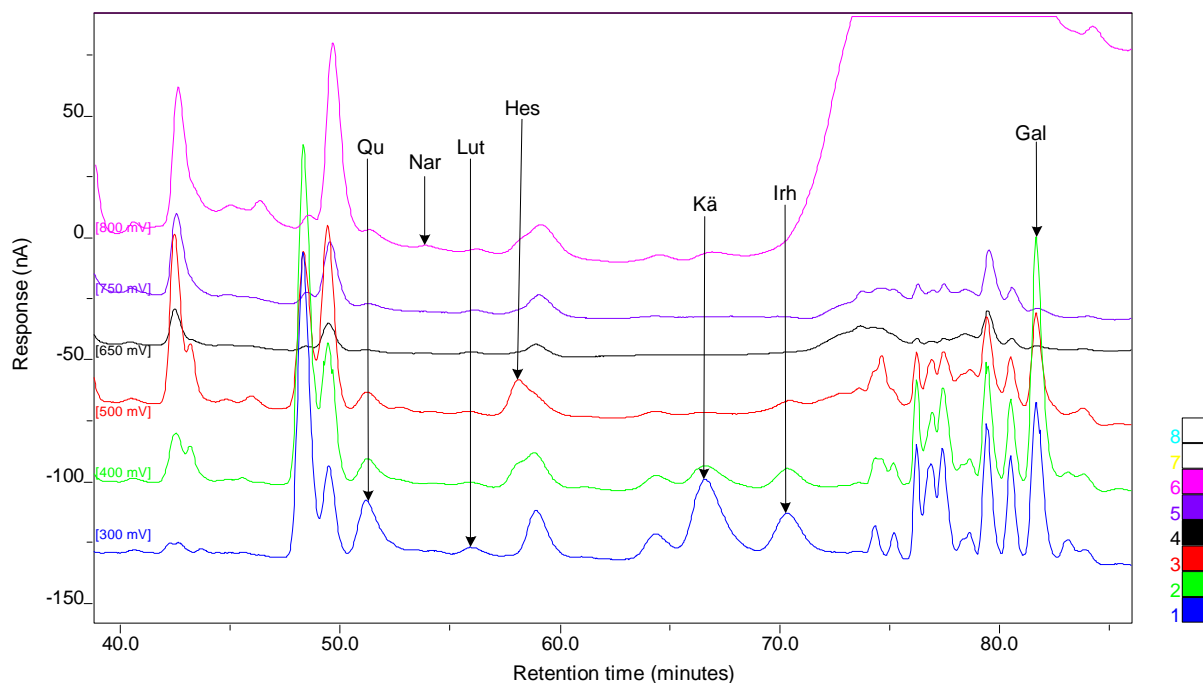


Abbildung 33: CEAD-Chromatogramm einer Bio-Orangenhonig-Probe

6.3.2 Identifizierung der Flavonoide

Den ersten Hinweis, dass bestimmte Flavonoide in der Probe vorliegen, lieferte die Retentionszeit. Zur Absicherung der Identität wurden die Strom-Spannungskurven der Substanzen bei der entsprechenden Retentionszeit aufgenommen und mit jenen der Standardmischung verglichen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Strom-Spannungskurven konnte die Identität der Substanzen verifiziert werden.

6.3.3 Wiederfindung mittels Standardaddition

Die Ausbeuten der Flavonoide bei der Extraktion wurden bestimmt indem die Honigprobe zuerst extrahiert und mittels HPLC-CEAD vermessen wurde und die Flavonoidkonzentrationen über Kalibriergeraden errechnet wurden. Danach wurden drei Aliquoten der Honigprobe 50%, 100% und 150% der ermittelten Flavonoidkonzentrationen zugesetzt. Die drei gespikten Honigproben und eine ungespikte Probe wurden aufgearbeitet und mittels HPLC-CEAD analysiert. Die Steigung der durch Auftragen der Peakhöhe gegen die zugesetzte Flavonoidkonzentration erhaltenen Regressionsgerade wurde mit der der Standard-Kalibrierfunktion verglichen (Abbildung 34) und mit folgender Formel die Wiederfindung berechnet:

$$\text{Wiederfindung}(\%) = \frac{\text{Steigung}(\text{Stdaddition})}{\text{Steigung}(\text{Eichfunktion})} \cdot 100$$

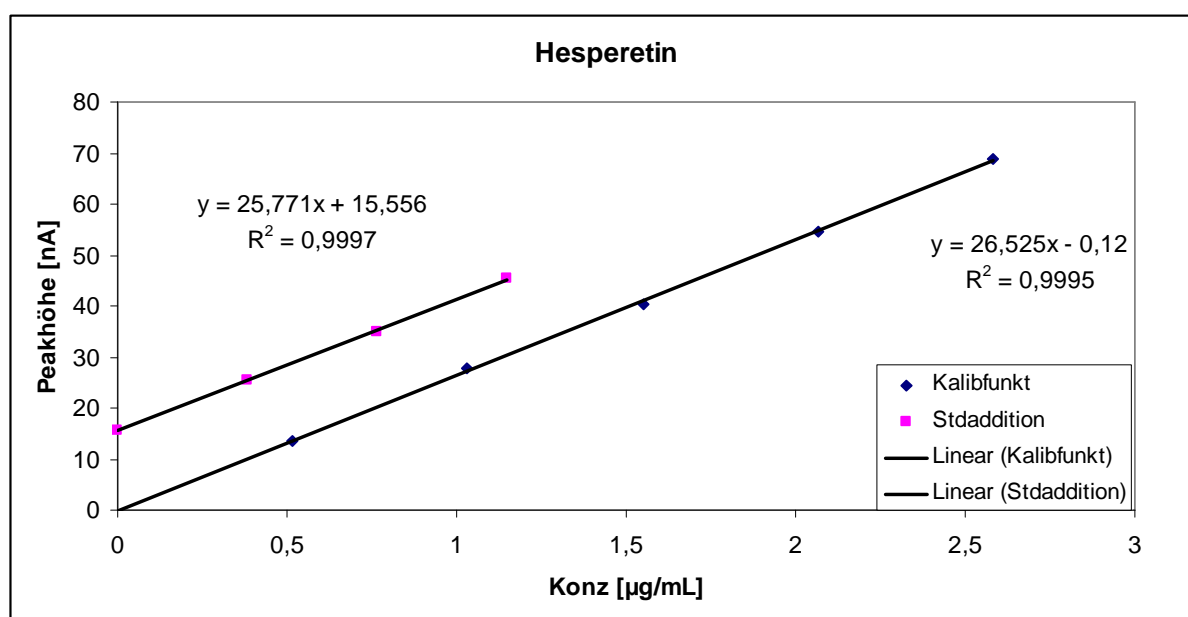


Abbildung 34: Ermittlung der Wiederfindung von Hesperetin in Bio-Orangenhonig mittels Standardaddition

Wie aus Tabelle 15 und Abbildung 35 ersichtlich ist, hat die Probenmatrix Einfluss auf die Wiederfindung der einzelnen Flavonoide. In flüssigem Honig liegen die Ausbeuten bei den untersuchten Flavonoiden über 96%. In Honigen mit cremiger Konsistenz und mit freiem Auge sichtbaren Zuckerkrystallen sind die Ausbeuten geringer. Sie liegen aber über 89%, bei Quercetin und Hesperetin sogar über 95%.

Tabelle 15: Wiederfindung (N=5) der Flavonoide in Creme- und flüssigem Honig

	Cremehonig - BioOrange			flüssiger Honig - Salbei		
	Mittelwert	s	RSD[%]	Mittelwert	s	RSD[%]
QU	98,2	5,17	5,26	98,0	2,21	2,25
NAR	93,1	7,30	7,84			
LUT	89,2	6,30	7,07	100	6,07	6,06
HES	95,4	9,04	9,48			
KAE	94,6	7,79	8,24	96,2	4,47	4,65
IRH	89,9	3,69	4,10	99,6	3,54	3,55
GAL	90,3	6,88	7,62	96,8	2,23	2,30

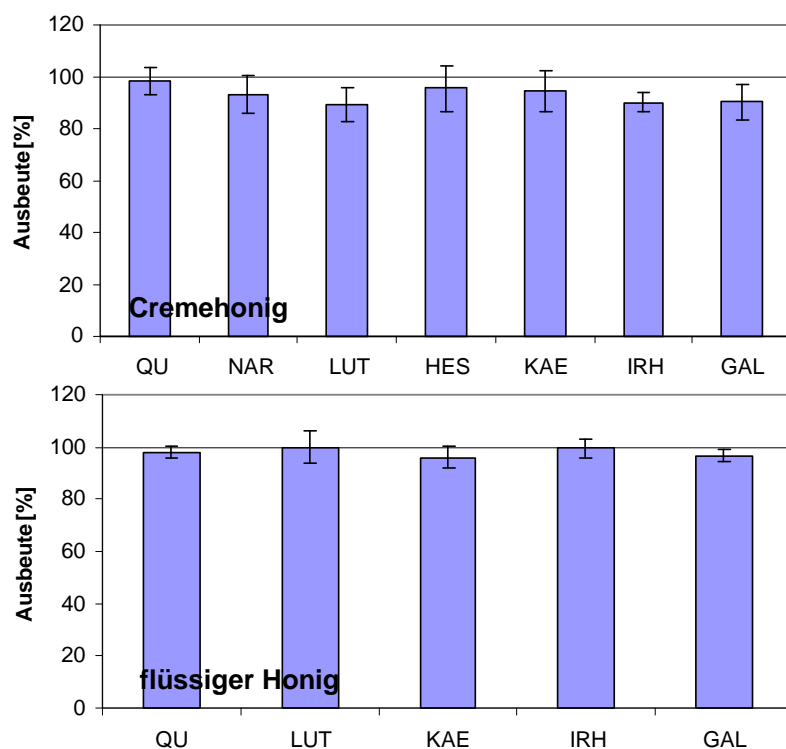


Abbildung 35: Wiederfindung der Flavonoide in Creme- und flüssigem Honig

6.3.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze.

Für den Kanal +300 mV betrug das Rauschen 0,164 nA, für +400 mV 0,054 nA, für +500 mV 0,059 nA und für +800 mV 0,060 nA.

Die Nachweisgrenze wurde rechnerisch über das Einsetzen des dreifachen Rauschens ($S/N=3$) (0,492 nA, 0,162 nA, 0,177 nA bzw. 0,180 nA) in die Kalibrierfunktionen (Abbildung 31) ermittelt.

Für die Bestimmung der Bestimmungsgrenze wurde die zehnfache Höhe des Rauschens ($S/N=10$) (1,641 nA, 0,541 nA, 0,591 nA bzw. 0,599 nA) in die Kalibrierfunktionen eingesetzt.

Tabelle 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Flavonoide in einer Bio-Orangenhonigprobe

Flavonoid	Myr	Qu	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal
S/N 3 ($\mu\text{g/kg}$)	8,2	4,5	4,7	4,5	3,7	6,1	8,3	1,6
S/N 10 ($\mu\text{g/kg}$)	22	13	27	13	8,9	18	21	3,9

6.3.5 Reproduzierbarkeit

Die Berechnung der Reproduzierbarkeit erfolgte mit Hilfe der in Abschnitt 6.1.5 angeführten Gleichungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Intraday- und Interday-Reproduzierbarkeit bestimmt an einer Bio-Orangenhonigprobe

		Intraday	Interday
	Mittelwert ($\mu\text{g/g}$)	RSD[%]	RSD[%]
Quer	0,16	4,68	4,48
Nar	0,05	4,26	8,24
Lut	0,03	2,73	2,47
Hes	0,25	5,57	6,91
Kä	0,34	4,71	5,01
Irh	0,33	5,72	8,49
Gal	0,61	3,72	4,27

6.3.6 Darstellung einiger Chromatogramme

In den Abbildungen 36 - 44 sind die für verschiedene Honigproben erhaltenen Chromatogramme dargestellt.

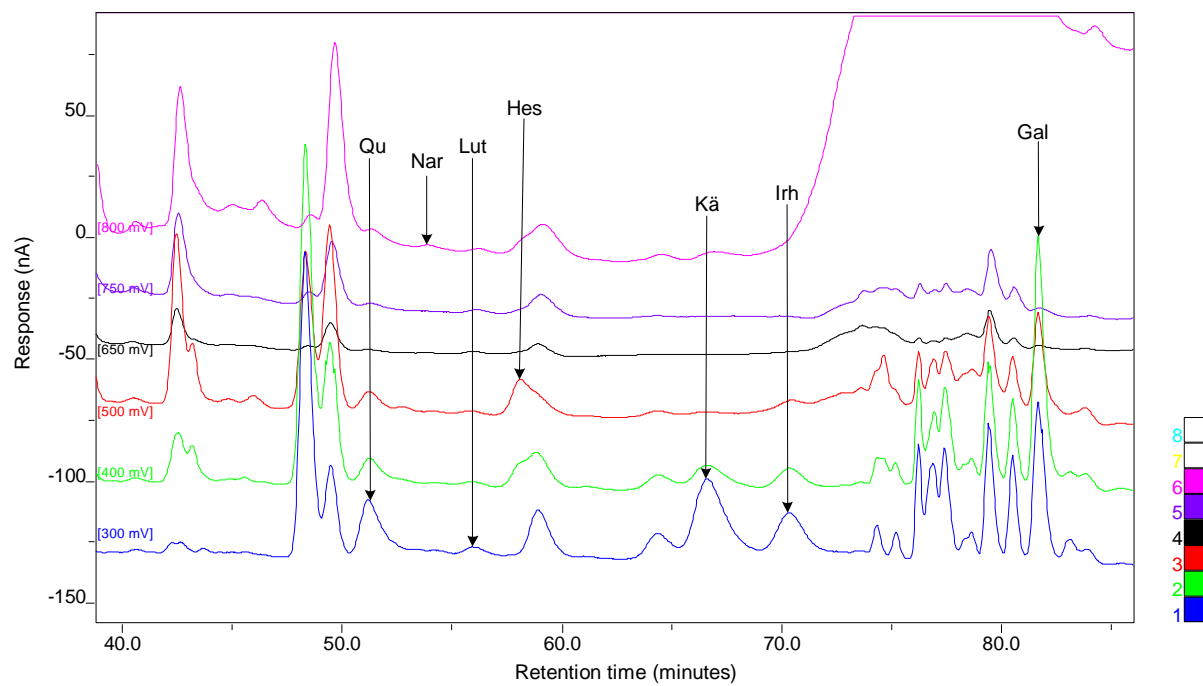


Abbildung 36: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Bio-Orangenhonig-Probe

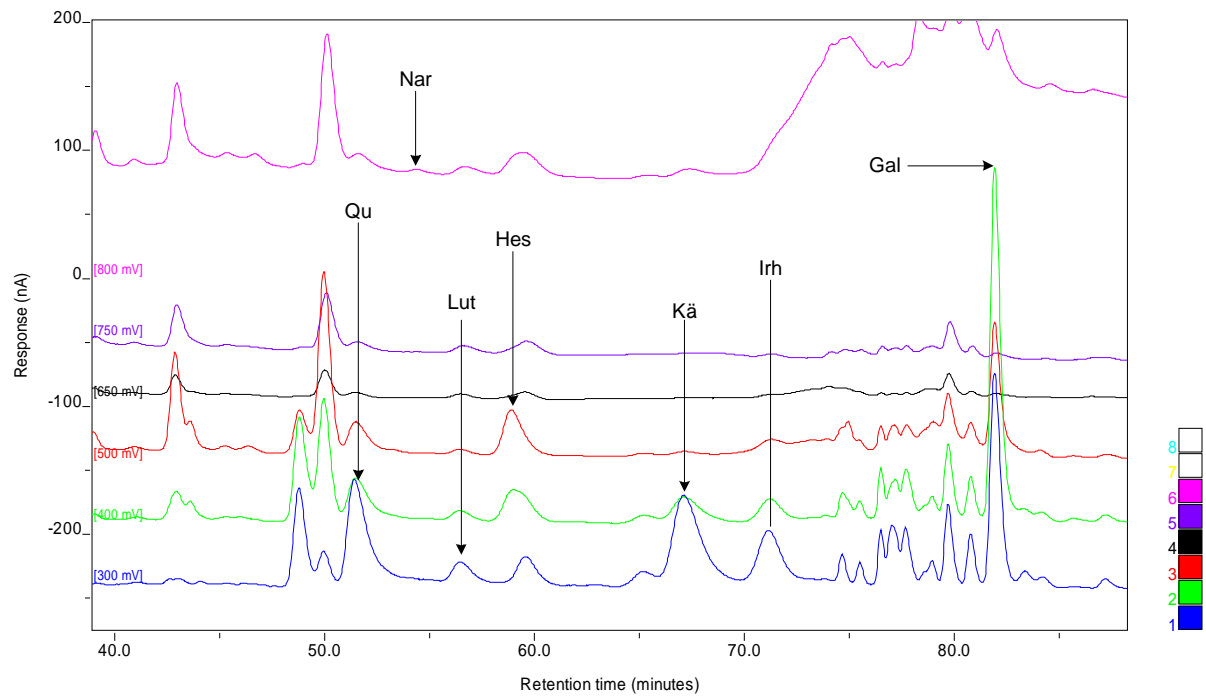


Abbildung 37: CEAD-Chromatogramm einer Bio-Orangenhonig-Probe mit 100%igem Flavonoid-zusatz

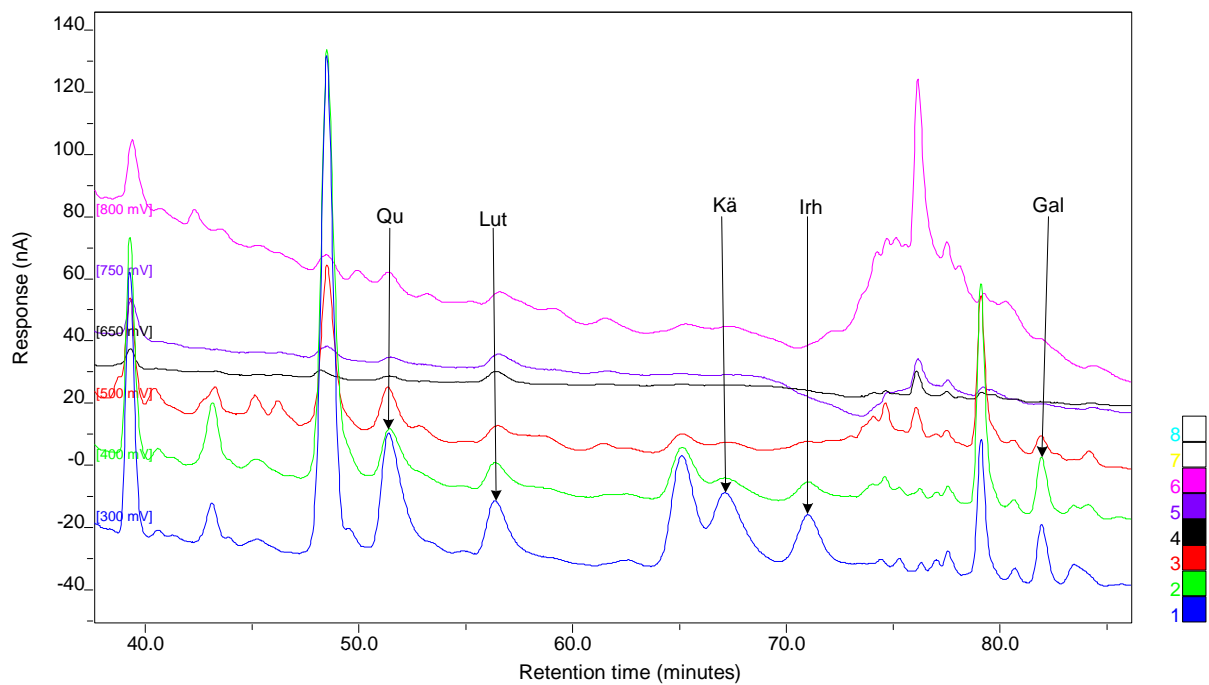


Abbildung 38: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Salbeihonig-Probe

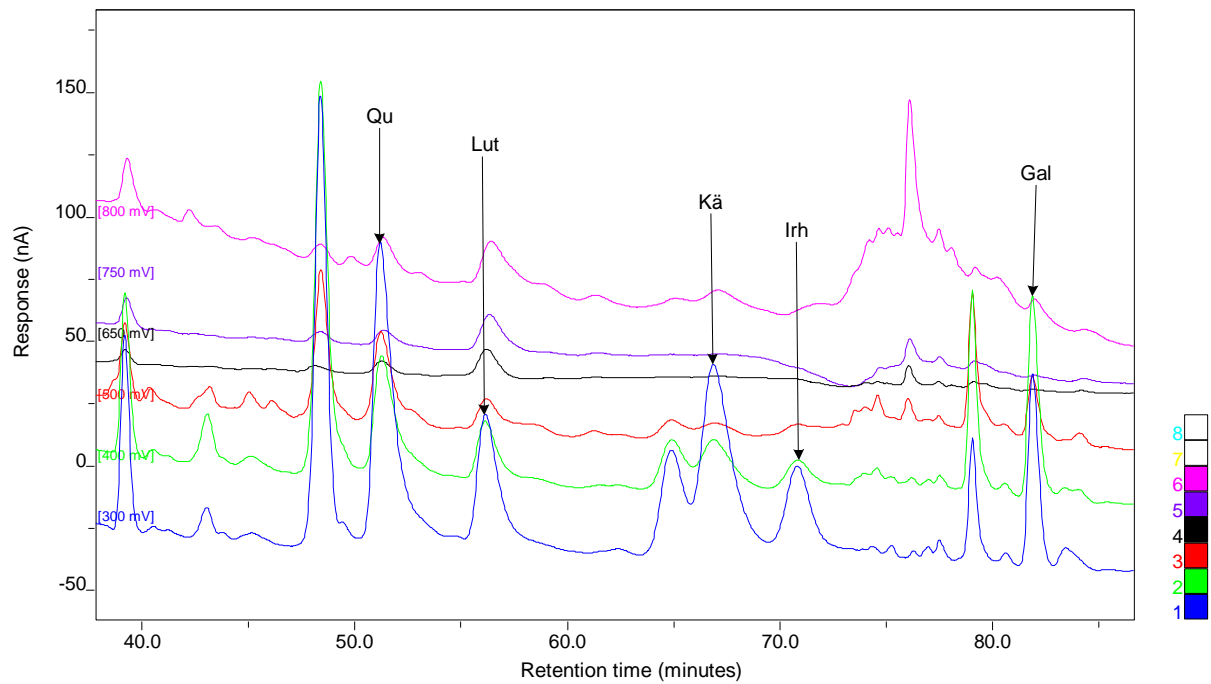


Abbildung 39: CEAD-Chromatogramm einer Salbeihonig-Probe mit 100%igem Flavonoidzusatz

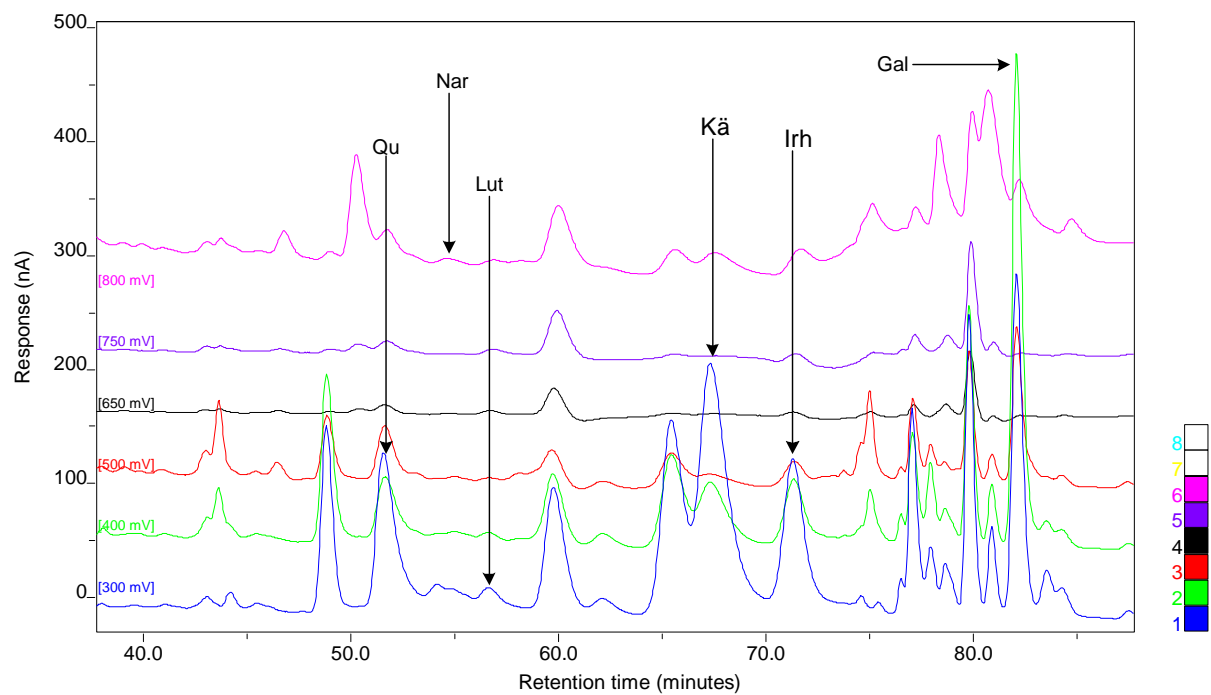


Abbildung 40: CEAD-Chromatogramm einer Kirschblütenhonig-Probe

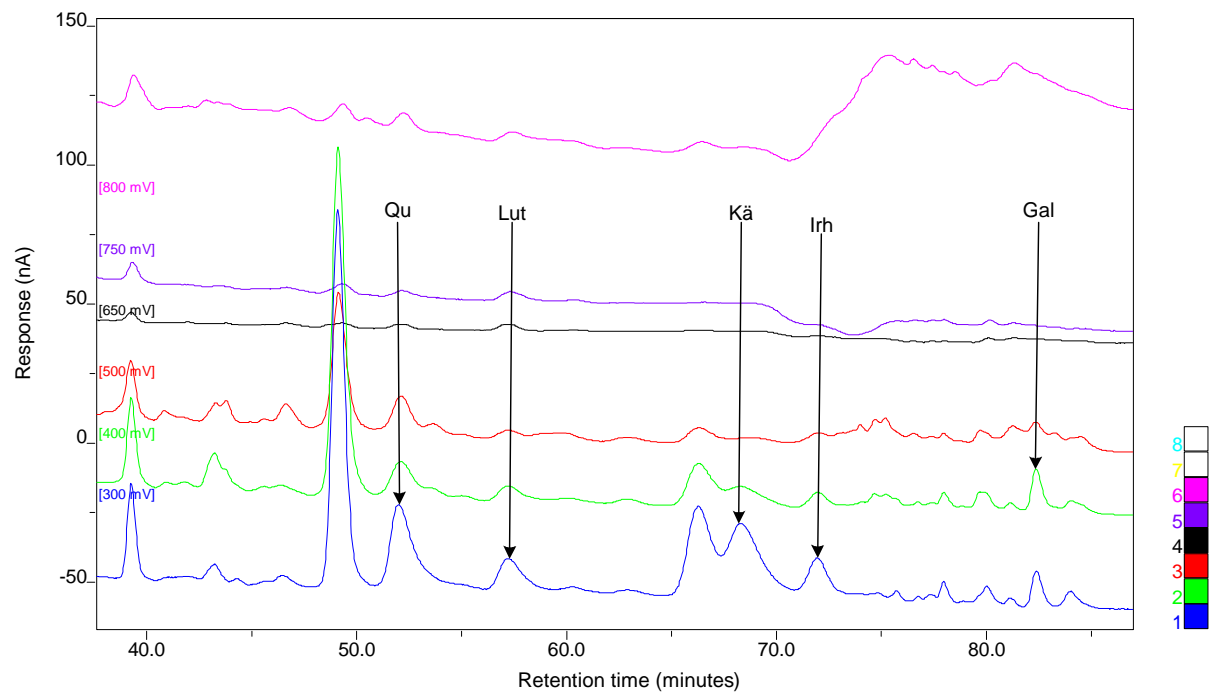


Abbildung 41: CEAD-Chromatogramm einer Lavendelhoney-Probe

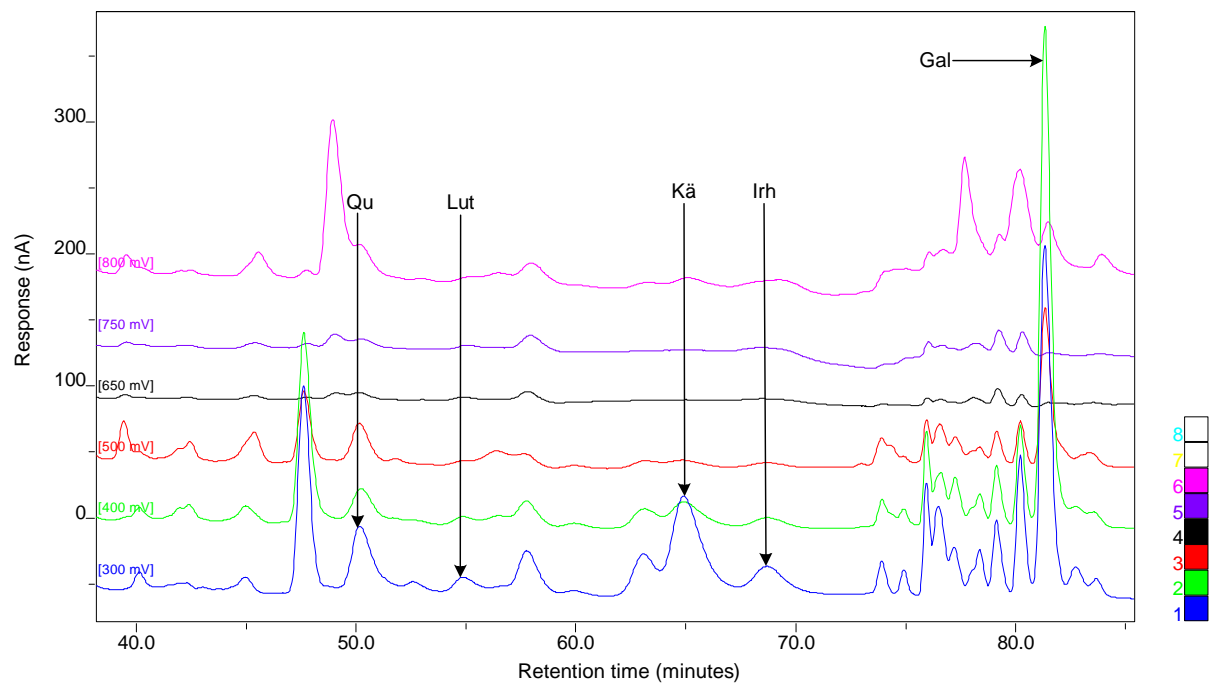


Abbildung 42: CEAD-Chromatogramm einer Phaceliahoney-Probe

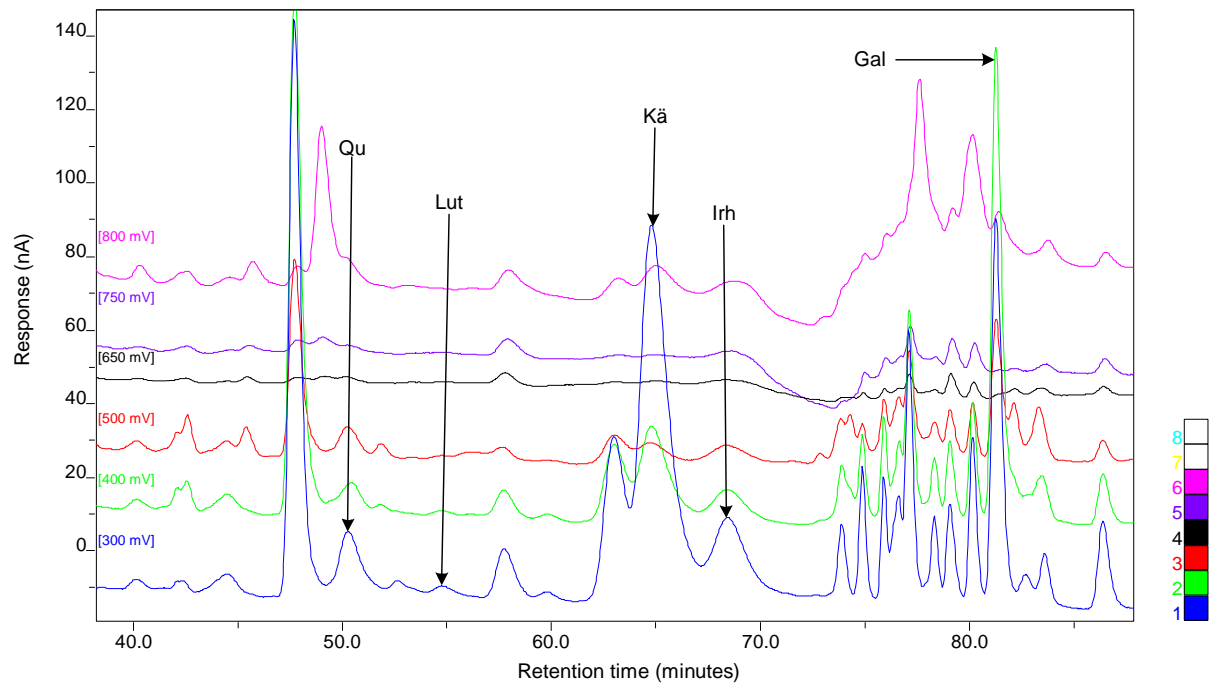


Abbildung 43: CEAD-Chromatogramm einer Rhododendronhonig-Probe

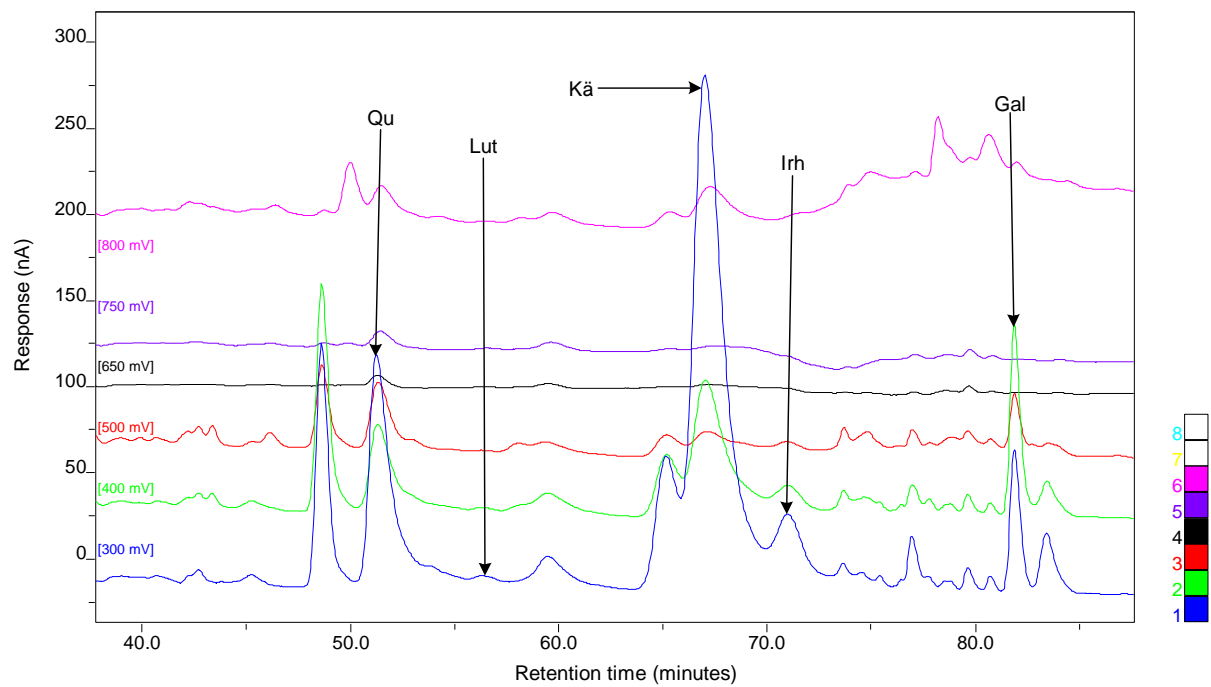


Abbildung 44: CEAD-Chromatogramm einer Rapshonig-Probe

6.3.7 Zusammenfassung der experimentellen Daten und Ergebnisse zur Trennung von Flavonoiden in Honigproben

Abschließend sind die experimentellen Parameter der Trennung und Detektion und die optimalen Detektionskanäle, sowie die Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und die Reproduzierbarkeit der Methode, die an Hand einer Bio-Orangenhonig-Probe ermittelt wurden, zusammengefasst.

6.3.7.1 Trennung und Detektion

Laufmittel A: Methanol/Phosphatpuffer (20/80, v/v), pH 3,2

Laufmittel B: Methanol/Phosphatpuffer (80/20, v/v), pH 3,2

Flussrate: 1 mL/min

Säulentemperatur: 20°C

Injektionsvolumen: 15 µL

A	B	Zeit
100%	0%	0 min
60%	40%	40 min
60%	40%	65 min
30%	70%	70 min
30%	70%	85 min
20%	80%	100 min
100%	0%	102 min
100%	0%	120 min

Detektorpotentiale: +300, +400, +500, +650, +750, +800, +200³ +100² mV

³ Diese Potentiale wurden ausgewählt, weil die letzten Zellen sehr hohe Grundströme zeigten

6.3.7.2 Optimaler Detektionskanal, Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Reproduzierbarkeit

Tabelle 18: Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse der Analyse von Honigproben (n.d. ... nicht detektiert)

	optimaler Detektions- kanal	Ausbeute flüssiger Honig	Ausbeute Creme- honig	Nachweis- grenze	Bestimmungs- grenze	Reprodu- zierbarkeit Intraday	Reprodu- zierbarkeit Interday
Myricetin	+300 mV	n.d	n.d.	8,2 µg/kg	22 µg/kg	n.d.	n.d.
Quercetin	+300 mV	98	98,2	4,5 µg/kg	13 µg/kg	4,9%	4,8%
Naringenin	+800 mV	n.d	93,1	4,7 µg/kg	27 µg/kg	5,8%	9,6%
Luteolin	+300 mV	100	89,2	4,5 µg/kg	13 µg/kg	4,0%	6,1%
Hesperetin	+500 mV	n.d.	95,4	3,7 µg/kg	8,9 µg/kg	4,0%	8,4%
Kämpferol	+300 mV	96,2	94,6	6,1 µg/kg	18 µg/kg	3,4%	4,3%
Isorhamnetin	+300 mV	99,6	89,9	8,3 µg/kg	21 µg/kg	4,6%	9,9%
Galangin	+400 mV	96,8	90,3	1,6 µg/kg	3,9 µg/kg	2,6%	4,9%

6.4 Qualitative Untersuchung der Honigproben mittels HPLC-MS

Honigproben, bei denen nach der HPLC-CEAD-Messung noch Unsicherheiten bei der Identifizierung der Substanzen bestanden, wurden zusätzlich mit HPLC-ESI-MS analysiert.

Bei der Messung einer 1 mg/L-Standardmischung (Details siehe Kapitel 5.7) stellte sich heraus, dass sich sowohl der positive als auch der negative Modus für die qualitative Analyse der Honige eignen. Daher wurden sämtliche Honigproben im positiven und auch im negativen Modus gemessen.

Die Identifizierung der Flavonoide erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten und der MS-Daten der Honigproben mit jenen einer Standardmischung. Aus dem Gesamtionen-Chromatogramm (Total Ion Chromatogram, TIC) (Abbildung 45 (A)) wurden mittels der Auswertesoftware die Extracted-Ion-Chromatogramme (EIC) (Abbildung 45 (B-E), Abbildung 46 (A), Abbildung 47 (A)) der einzelnen Molekülonen (Tabelle 19) erhalten. Durch Vergleich der Retentionszeiten der Standardsubstanzen in den EIC mit jenen der Honigproben konnten die Peaks einzelnen Flavonoiden zugeordnet werden. Mit Hilfe der Funktion „identify“ wird die Massenverteilung eines Peaks [Abbildung 46 (B, C), Abbildung 47 (B, C)] angezeigt, anhand der man den Anteil des Molekülonen am Peak abschätzen kann.

Tabelle 19: Massen der Molekülonen der Flavonoide

Flavonoid	Myr	Qu	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal
[M ⁺]	319,2	303,2	273,3	287,2	303,2	287,2	317,3	271,2
[M ⁻]	317,2	301,2	271,3	285,2	301,2	285,2	315,3	269,2

Die folgenden Abbildungen illustrieren die Vorgehensweise bei der Identifizierung der Flavonoide in einer Bio-Orangenprobe. Auf diese Weise wurden in einigen anderen Honigen die vorliegenden Flavonoide ebenfalls identifiziert (siehe Tabelle 20).

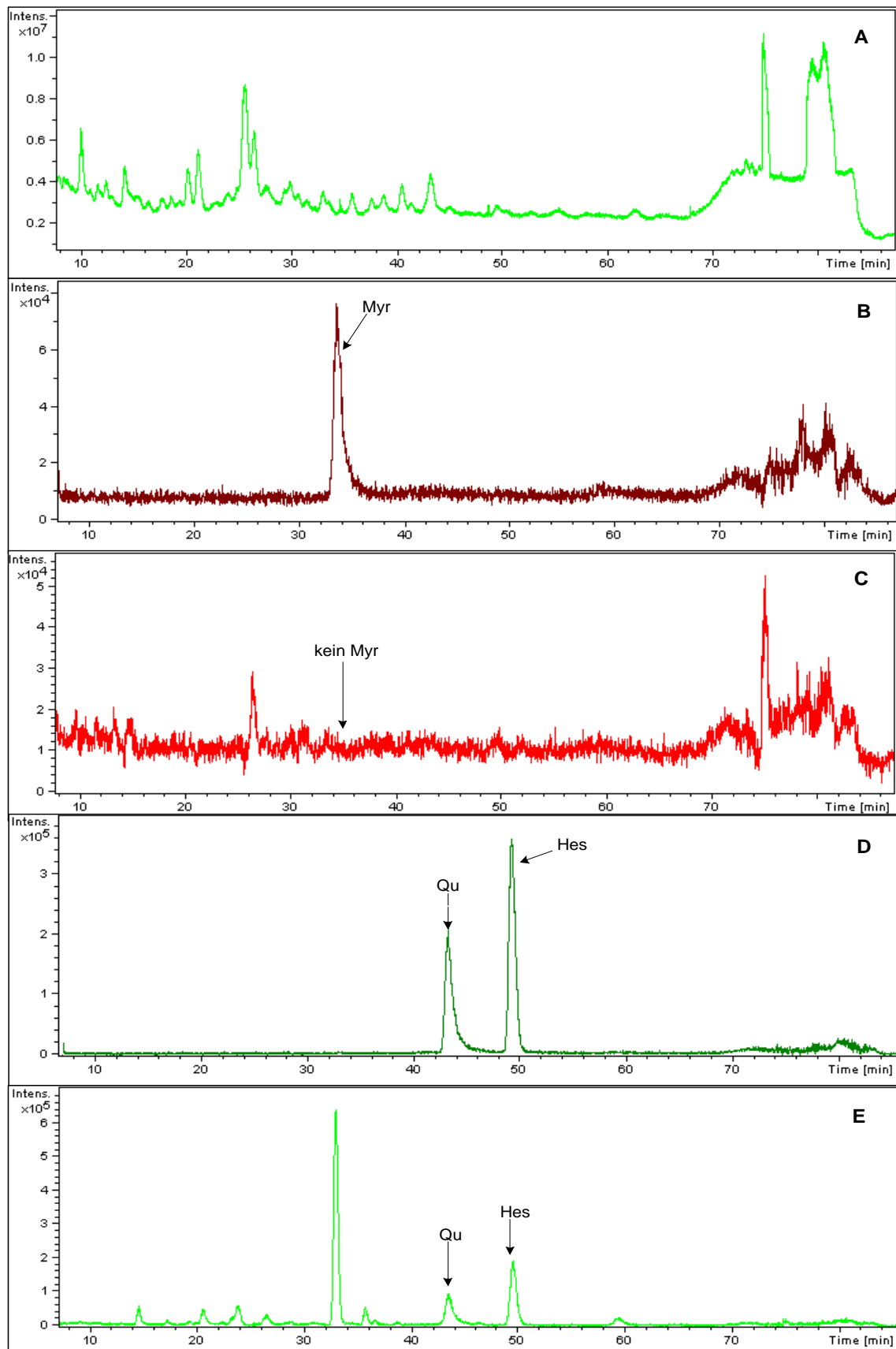


Abbildung 45: TIC- und EIC-Chromatogramme: (A) TIC der Bio-Orangenhonigprobe, (B) EIC der Standardmischung bei 319,2 m/z , (C) EIC des Honigs bei 319,2 m/z , (D) EIC der Standardmischung bei 303,2 m/z , (E) EIC des Honigs bei 303,2 m/z

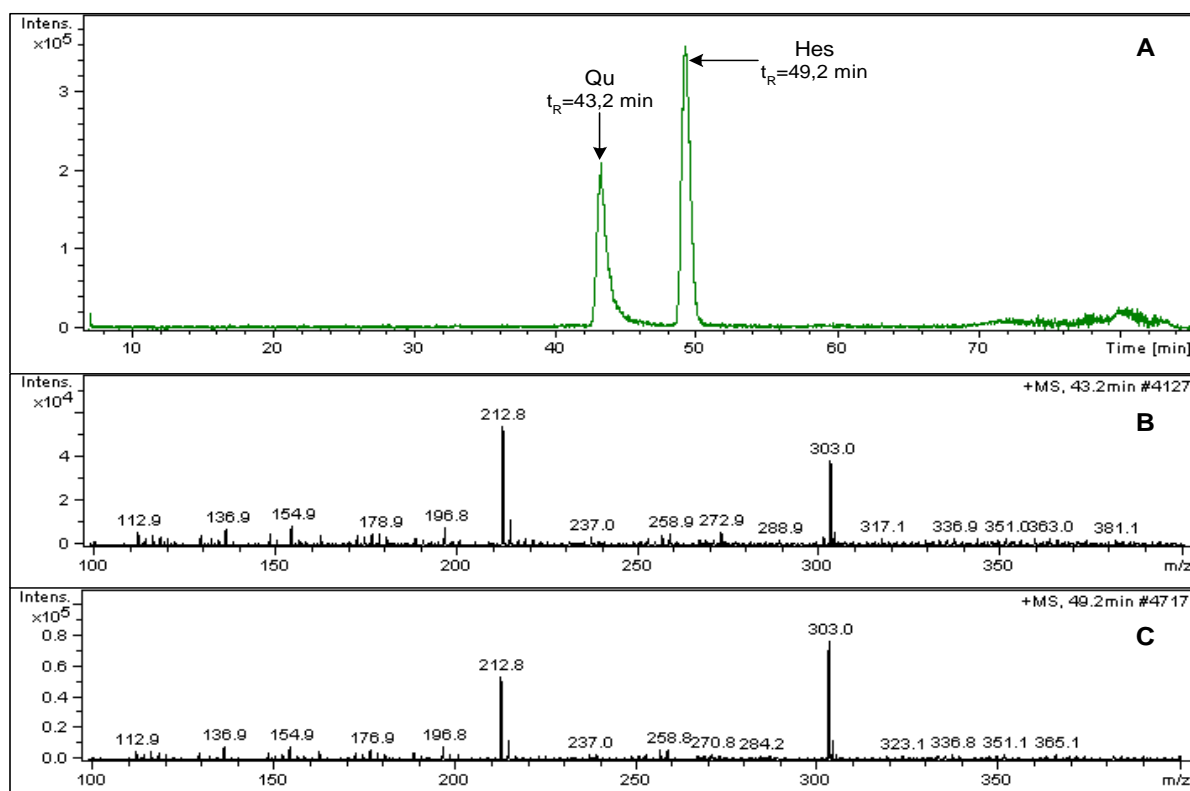


Abbildung 46: (A) EIC-Chromatogramm der Standardmischung bei 303,2 m/z, (B) Massenverteilung des Peaks bei $t_R = 43,2$ min (Quercetin), (C) Massenverteilung des Peaks bei $t_R = 49,2$ min (Hesperetin)

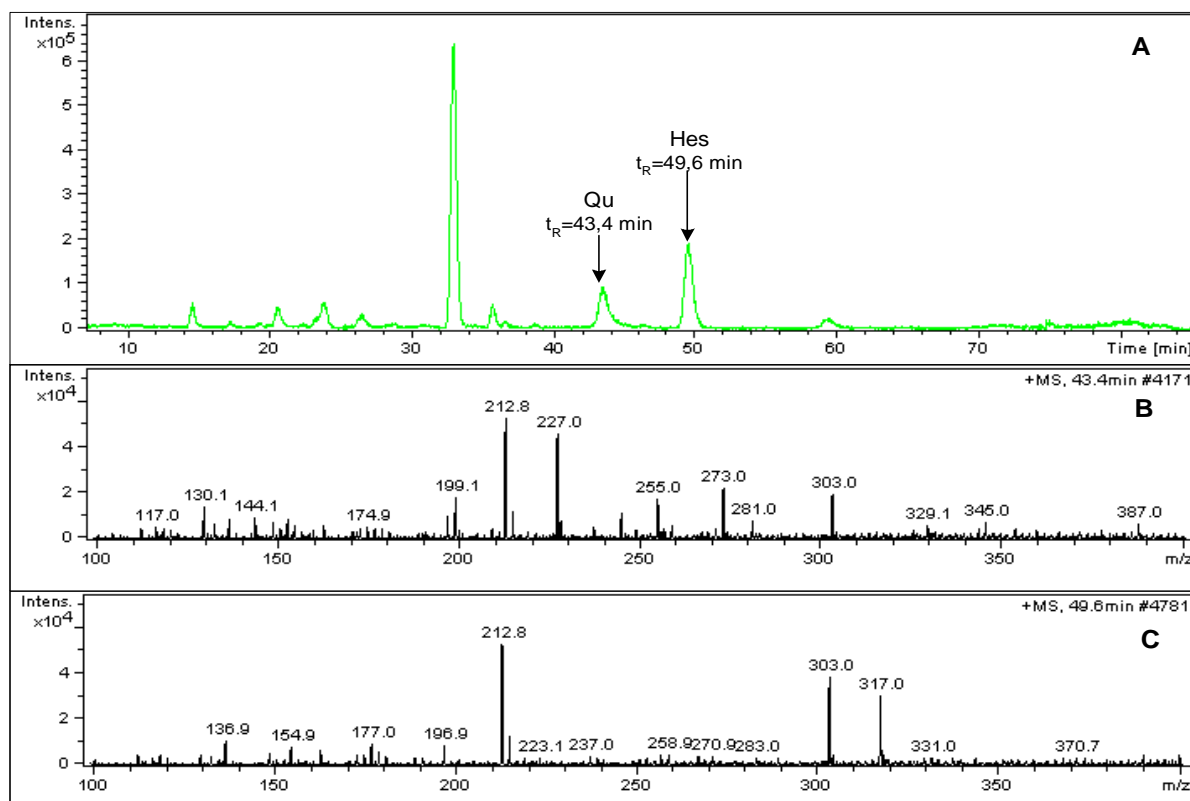


Abbildung 47: (A) EIC-Chromatogramm des Bio-Orangenhonigs bei 303,2 m/z, (B) Massenverteilung des Peaks bei $t_R = 43,4$ min (Quercetin), (C) Massenverteilung des Peaks bei $t_R = 49,6$ min (Hesperetin)

Die Ergebnisse der HPLC-ESI-MS-Analyse der untersuchten Honigproben sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Sie bestätigten die Resultate der HPLC-CEAD-Untersuchung.

Tabelle 20: Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels HPLC-MS

	Myr	Quer	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal
positive mode								
Bio-Orange	-	+	+	+	+	+	+	+
Rhododendron	-	+	+	+	-	+	+	+
Raps	-	+	-	+	-	+	+	+
Himbeere	-	+	-	+	-	+	+	+
Rosmarin	-	+	+	+	-	+	+	+
Melone	-	+	-	+	-	+	+	+
Kürbis	-	+	-	+	-	+	+	+
Kirsche	-	+	+	+	-	+	+	+
negative mode								
Bio-Orange	-	+	+	+	+	+	+	+
Melone	-	+	-	+	-	+	+	+

6.5 Quantitative Analyse der Honigproben mittels HPLC-CEAD

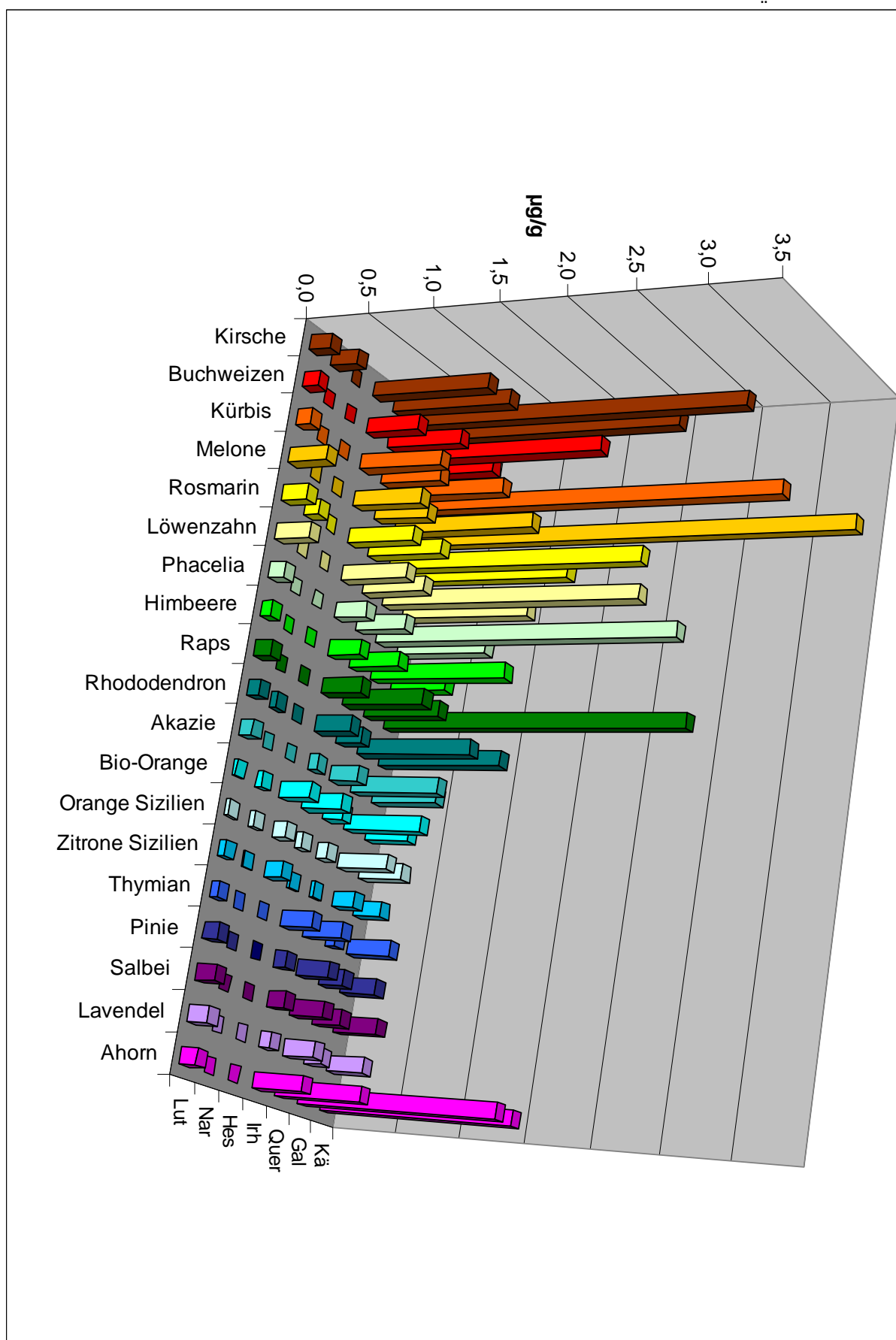
Neunzehn Honige unterschiedlicher Sorten und Herkunft wurden mit der von mir entwickelten Methode untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Flavonoidkonzentrationen der analysierten Honigproben (n.d. ... nicht detektiert)

	Myr	Qu	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal
	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
Ahorn	n.d.	0,66	n.d.	0,13	n.d.	1,50	0,39	1,53
Lavendel	n.d.	0,25	n.d.	0,16	n.d.	0,29	0,081	0,13
Salbei	n.d.	0,27	n.d.	0,16	n.d.	0,35	0,14	0,23
Pinie	n.d.	0,26	n.d.	0,12	n.d.	0,29	0,10	0,20
Thymian	n.d.	0,31	n.d.	0,062	n.d.	0,34	0,25	0,081
Zitrone Sizilien	n.d.	0,029	0,014	0,059	0,14	0,22	0,021	0,18
Orange Sizilien	n.d.	0,088	0,041	0,027	0,11	0,35	0,062	0,39
Bio-Orange	n.d.	0,16	0,050	0,028	0,25	0,34	0,33	0,61
Akazie	n.d.	0,23	n.d.	0,098	n.d.	0,52	0,073	0,69
Rhododendron	n.d.	0,20	0,054	0,10	n.d.	0,98	0,29	0,90
Raps	n.d.	0,65	n.d.	0,13	n.d.	2,36	0,32	0,60
Himbeere	n.d.	0,40	n.d.	0,085	n.d.	0,45	0,26	1,08
Phacelia	n.d.	0,40	n.d.	0,13	n.d.	0,72	0,26	2,34
Löwenzahn	n.d.	0,51	n.d.	0,28	n.d.	1,01	0,53	2,02
Rosmarin	n.d.	0,59	0,12	0,20	n.d.	1,29	0,53	1,99
Melone	n.d.	0,43	n.d.	0,31	n.d.	3,39	0,54	1,11
Kürbis	n.d.	0,49	n.d.	0,12	n.d.	2,84	0,65	0,83
Buchweizen	n.d.	0,60	n.d.	0,13	n.d.	0,55	0,42	1,56
Kirsche	n.d.	0,95	0,22	0,18	n.d.	1,99	0,94	2,62

Abbildung 48 gibt einen besseren Überblick über die Analysendaten und lässt die Unterschiede im Flavonoidmuster und in der Flavonoidzusammensetzung besser erkennen.

Abbildung 48: Überblick über die Flavonoidmuster der untersuchten Honigproben



7 DISKUSSION

Die im Rahmen der Diplomarbeit erarbeiteten Analysenergebnisse sollen im Anschluss dargestellt, interpretiert und mit den Daten aus anderen Publikationen verglichen werden.

7.1 Vergleich der Flavonoidkonzentrationen der untersuchten Honigproben

In Tabelle 21 und den Abbildungen 48 und 49 sind die Analysenergebnisse der vorliegenden Diplomarbeit zusammengefasst.

Wie in Tabelle 21 ersichtlich, konnte in keiner der untersuchten Honigproben Myricetin nachgewiesen werden.

Im Allgemeinen haben Honige, die Kräuter als botanischen Ursprung haben (Thymian, Salbei, Lavendel) einen niedrigeren Flavonoidgehalt und weniger komplexe Flavonoidspektren als andere Honige. Die geringsten Gesamtflavonoidmengen wurden in Zitronenhonig (0,67 µg/g) gefunden, die mit Abstand höchste Flavonoidkonzentration wurde in Kirschblütenhonig (6,89 µg/g) nachgewiesen.

Hesperetin konnte, wie erwartet, nur in Zitrushonigen (Orange und Zitrone) in Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,25 µg/g gefunden werden. Überraschend war hingegen das Vorhandensein von Naringenin in Kirschen- (0,22 µg/g) und Rhododendronhonigen (0,05 µg/g), da dieses Flavonoid hauptsächlich mit Zitrusfrüchten in Verbindung gebracht wird.

Melonen- und Kürbisblütenhonig weisen ein sehr ähnliches Flavonoidmuster auf, das von Kämpferol dominiert wird, welches in einer etwa 3 mal so hohen Konzentration vorkommt wie das mengenmäßig nächstgereichte Galangin.

Raps enthält eine große Menge an Kämpferol, in etwa das Vierfache von Quercetin und Galangin.

Ein hoher Galangingehalt in Kirschblüten-, Phacelia-, Löwenzahn-, Rosmarin- und Ahornhonig weist auf einen beträchtlichen Beitrag von Propolis hin.

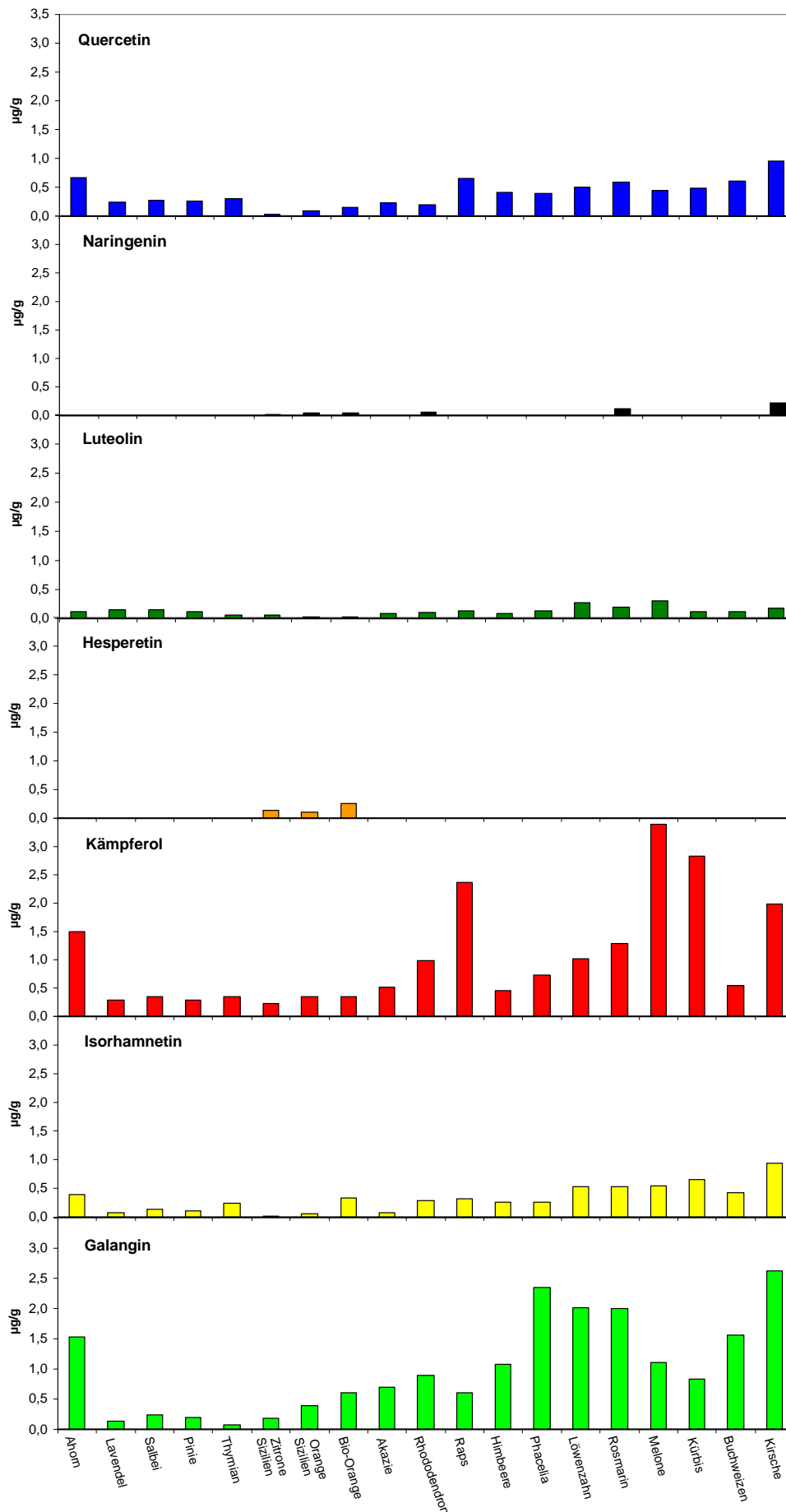


Abbildung 49: Vergleich der Flavonoidkonzentrationen in den untersuchten Honigen

Laut Literatur [58] könnte ein hoher Kämpferolgehalt ein Hinweis auf Rosmarinhonig sein. Tatsächlich enthält Rosmarinhonig zwar beträchtliche Mengen an Kämpferol, wesentlich höhere Konzentrationen wurden aber in Kürbis-, Melonen-, Kirschblüten und Rapshonig gefunden.

Die untersuchten Honige weisen unterschiedliche Flavonoidprofile auf, trotzdem kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass diese für die jeweilige Honigsorte typisch sind, da von jeder Sorte nur eine Probe untersucht wurde. Außerdem ist es nicht möglich abzuschätzen, wie viel der gefundenen Flavonoidmengen tatsächlich von der Pflanze stammen, von der der Nektar oder der Honigtau gesammelt wurde und wie groß der Anteil ist, der von Propolis stammt. Truchado et al. [72] analysierten einen Honig, der durch Fütterung der Bienen mit Zuckersirup hergestellt wurde. Die darin nachgewiesenen Flavonoide Pinobanksin, Pinocembrin und Chrysin können daher nicht pflanzlichen Ursprungs sein, sondern müssen durch Propolis in den Honig gelangen. Propolis enthält Pinobanksin, Pinocembrin, Chrysin und Galangin [44, 52, 56-59, 80] und viele andere Flavonoide, auch Quercetin, Kämpferol, Naringenin und Apigenin, in geringen, aber signifikanten Mengen [34, 93]. In Ländern mit tropischem Klima müssen die Sekrete anderer Bäume als der in gemäßigtem Klima üblichen Pappel für die Propolisherstellung verwendet werden. Daher haben Honige aus diesen Regionen [44, 57, 59] ein anderes phenolisches Muster, was einen Hinweis auf den geographischen Ursprung liefern könnte.

Um Honigsorten eindeutig charakterisieren zu können, braucht es Markersubstanzen, wie Hesperetin für Zitrushonige, die ausschließlich in einer bestimmten Sorte vorkommen oder Profile von Substanzklassen, die nur vom botanischen Ursprung und nicht von geographischen und Umwelteinflüssen beeinflusst werden.

7.2 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Publikationen

7.2.1 Aufarbeitung

Durch Verwendung des selektiven coulometrischen Elektroden-Array-Detektors konnte die Aufarbeitung der Proben vereinfacht werden. Nach der Extraktion der Flavonoide mit Amberlite XAD-2 Harz war eine nachfolgende Etherextraktion, wie in [49] beschrieben, nicht erforderlich.

7.2.2 Charakteristische Flavonoide

In Tabelle 22 sind die Daten der in dieser Arbeit untersuchten Honigsorten, die auch schon in anderen Studien untersucht wurden nochmals, dargestellt. In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der zitierten Publikationen zusammengefasst.

Auch in dieser Arbeit wurde Hesperetin als Marker für Orangen- bzw. Zitrushonig, wie schon in anderen Studien [52, 53, 55, 56, 58, 79] bestätigt.

Eine hohe Kämpferolkonzentration wird als typisch für Rosmarinhonig [52, 58] angesehen. In dieser Diplomarbeit konnten aber auch in den bisher in keiner Publikation erwähnten Melonen-, Kürbis-, Ahorn- und Kirschblütenhonigen sehr große Mengen an diesem Flavonol nachgewiesen werden.

Von Andrade et al. [53] wurde Naringenin als Marker für Lavendelhonig vorgeschlagen und auch Amiot et al. [78] haben Naringenin in Lavendelhonig nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte in Lavendelhonig kein Naringenin nachgewiesen werden, dafür enthielten Zitrushonige, Rosmarin- und vor allem Kirschblütenhonig dieses Flavanon.

Quercetin wurde als Marker für Sonnenblumenhonig vorgeschlagen [58]. In der vorliegenden Arbeit wurde kein Sonnenblumenhonig untersucht, aber es wurden auch in anderen Honigsorten höhere Quercetinmengen gefunden, vor allem in Kirschblüten, Ahorn- und Rapshonig, damit kann Quercetin keine Markersubstanz sein. Ein hoher Quercetiningehalt in Rapshonig wurde auch von Tomás-Barberán et al. [58] festgestellt.

Kénjeric et al. [62] konnten für Akazienhonig kein spezifisches Flavonoid identifizieren, dennoch hatten alle Honigproben ein ähnliches Flavonoidprofil. Leider kann dieses Profil mit den Daten dieser Arbeit nicht verglichen werden, da das in der Studie mengenmäßig am stärksten vertretene Flavonoid Chrysin nicht quantifiziert werden konnte.

Von Kénjeric et al. [63] konnten in Salbei Myricetin und Isorhamnetin nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte Myricetin nicht gefunden werden, aber Isorhamnetin war in signifikanten Mengen zugegen.

Wie aus Tabelle 22 ersichtlich, reicht der Konzentrationsbereich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Flavonoide von etwa 1,5 bis hin zu 240 µg/100 g. In der Literatur wurden ähnliche Flavonoidkonzentrationen von ca. 2 bis 320 µg/100 g gefunden (siehe Tabelle 23). Die genauen Konzentrationen der einzelnen Flavonoide weichen teilweise aber sehr stark von einander ab. Beispielsweise stimmen die von mir gemessenen Flavonoidkonzentrationen für Rapshonig einigermaßen mit denen von Tomás-Barberán et al. [58] überein, nicht aber mit den Daten, die von Ceksteryte et al. [70] ermittelt wurden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Honigproben aus unterschiedlichen Gebieten stammten.

Tabelle 22: Ermittelte Flavonoidkonzentrationen in µg/100 g (n.d. ... nicht detektiert)

	Qu	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal
Raps	64,54	n.d.	13,35	n.d.	235,86	31,78	60,39
Rosmarin	58,75	11,83	20,16	n.d.	128,63	52,64	199,45
Lavendel	24,58	n.d.	15,64	n.d.	28,87	8,08	12,89
Zitrone Sizilien	2,87	1,43	5,89	13,84	22,45	2,05	18,01
Orange Sizilien	8,82	4,12	2,71	11,00	34,70	6,18	38,93
Bio-Orange	15,88	4,99	2,79	25,11	34,14	32,72	60,82
Rhododendron	20,03	5,42	10,02	n.d.	98,06	28,79	90,12
Thymian	30,75	n.d.	6,18	n.d.	34,47	24,85	8,07
Akazie	22,65	n.d.	9,77	n.d.	51,87	7,29	69,08
Buchweizen	60,07	n.d.	12,82	n.d.	54,81	42,49	156,10
Salbei	27,09	n.d.	15,69	n.d.	34,89	14,21	23,49

Tabelle 23: In der Literatur ermittelte Flavonoidmuster bzw. -konzentrationen von sortenreinen Honigproben (Angaben in µg/100 g; + steht für identifiziert, - für nicht nachgewiesen)

	Myr	Qu	Nar	Lut	Hes	Kä	Irh	Gal	Referenz
Raps	-	+		+	-	+	+		[55]
		-		-	-	-	52,46	303,2	[52]
		69,47				321,02			[58]
		-	+			-			[78]
		8,9				37,8	78,7		[70]
Rosmarin		-	-	-	-	+		+	[53]
	-	-		-	-	+	+		[55]
		22		31		63	43	58	[56]
		-		-	-	19,54	2,74	-	[52]
		68,05		23,70		170,2			[58]
						95			[60]
						5,64			[71]
Lavendel	+	-	-	-	-	+		+	[67]
		-	-	-	-	+		+	[53]
	-	+		+	-	+	+		[55]
		66,5		47,5					[58]
Orange / Zitrus		+				+			[78]
		+	+	+	-	+		+	[53]
	-	-		-	+	+	+		[55]
		-		-	11,39	37,76	12,99	31,68	[52]
	10,1	-				7		38	[77]
Rhodo- dendron		45,65		41,10	74,50	76,73			[58]
					16,80				[79]
		-	-	-	+	-		-	[53]
Thymian	-	-		+	-	+	-		[55]
		-	-	-	-	+		-	[53]
	56,7	13,57		+	-	78,04	34,29	1,30	[52]
Akazie		6,7				-		18,5	[77]
		+	-	-	-	-		+	[53]
		9,34		19,35		35,65			[58]
	-	6,3 bzw		2,9 bzw		13,7 bzw	27,3 bzw		[62]
		30,2		2,2		27,5	49,6		
	-	295	82		42	38			[76]
			+						[78]
Buch- weizen	-	4,4				9,4		50,6	[77]
		18,51				44,48	+	88,78	[72]
		-	-	-	-	-		-	[53]
		-				Spuren		24	[44]
Salbei	-	34,6		10,4		14,4	-	36,5	[63]

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Honigsorten untersucht, wie z.B. die Honige von Ahorn, Pinie, Himbeere, Phacelia, Löwenzahn, Melone, Kürbis und Kirsche. Für die Muster dieser Sorten fehlen daher Vergleichswerte.

Es konnte gezeigt werden, dass der coulometrische Elektroden-Array-Detektor sich, neben Hesperetin [79], auch zur Analyse von anderen Flavonoiden eignet. Gegenüber dem in der Literatur am häufigsten verwendeten Dioden-Array-Detektor

hat diese Detektionsmethode den Vorteil, dass auf Grund ihrer Selektivität, ein zweiter Aufarbeitungsschritt bei der Probenvorbereitung unnötig ist.

Ein weiterer Vorteil des CEAD sind seine niedrigeren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Sie sind für Kämpferol mit 13 bzw. 36 µg/L um etwa eine Zehnerpotenz kleiner als die von Gómez-Caravaca et al. [71] mittels UV-Detektor erhaltenen Werte von 129 bzw. 430 µg/L. LOD und LOQ von Hesperetin liegen mit 7 bzw. 14 µg/L im Bereich der Grenzen die bereits von Liang et al. [79] mit elektrochemischer Detektion (4,1 bzw. 13 µg/L) erreicht wurden. Sie sind jedoch bedeutend niedriger als jene, die mit einem DAD (33 bzw. 100 µg/L) erhalten wurden.

8 ANHANG

8.1 Zusammenfassung

In dem von den Bienen gesammelten Nektar oder Honigtau sind Flavonoide enthalten, die typisch für die jeweilige Pflanze sind. Daher hängt das Flavonoidprofil einer Honigprobe mit der botanischen Quelle der Rohstoffe zusammen und könnte zur Identifizierung der Honigsorte herangezogen werden.

Ziel dieser Diplomarbeit war die Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von Flavonoiden in Honig mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gekoppelt mit einem coulometrischen Elektroden-Array-Detektor (CEAD) nach Extraktion der Substanzen mittels beschleunigter Lösungsmittlextraktion (ASE) aus der Honigmatrix.

Da mittels ASE keine zufrieden stellende Extraktion der Flavonoide aus dem Honig erreicht werden konnte, wurde zur Isolierung der phenolischen Fraktion auf die in anderen Studien sehr häufig verwendete Extraktion mittels des nichtionischen Polymerharzes Amberlite XAD-2 zurückgegriffen. Der übliche nachfolgende Aufreinigungsschritt war bei der von mir verwendeten Detektionsmethode nicht notwendig. Die anschließende Auftrennung des Extraktes erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) und einem Gradientenelutionsprogramm, bei dem die Elutionsmittel 20% Methanol in 20 mM Phosphatpuffer mit o-Phosphorsäure (85%) auf pH 3,2 gebracht und 80% Methanol in 20 mM Phosphatpuffer (pH 3,2 mit o-Phosphorsäure, 85%) verwendet wurden. Detektiert wurden die Flavonoide mittels CEAD bei sechs Potentialen zwischen +300 und +800 mV. Ausgewertet wurde über die Peakhöhen. Die Intraday- und Interday-Reproduzierbarkeit einer Standardlösung (1 mg/L) bzw einer Honigprobe (BioOrange) lagen zwischen 1,9 - 4,3% und 3,9 - 7,3 % bzw. zwischen 2,6 - 5,8% und 4,3 - 9,9%.

Die Nachweisgrenzen (S/N=3) und Bestimmungsgrenzen (S/N=10) für die Flavonoide in einer Standardlösung variierten zwischen 4 und 18 µg/L bzw. zwischen 7 und 45 µg/L, in den Honigproben wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zwischen 1,6 und 8,2 µg/kg bzw. 3,9 und 27 µg/kg gefunden. Die Wiederfindung

wurde mittels Standardaddition ermittelt und war in flüssigen Honigproben für die untersuchten Flavonoide über 96% und in Cremehonigen über 89%.

Die verschiedenen Honigsorten wiesen unterschiedliche Flavonoidmuster auf. Ob diese Muster sortentypisch sind, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da von jeder Art nur eine Probe mehrmals untersucht wurde. Die erhaltenen Daten unterscheiden sich teilweise von jenen der Literatur, aber auch die Literaturwerte variieren untereinander. Das kann daran liegen, dass die Pflanzen bei unterschiedlichen Umweltbedingungen unterschiedliche Flavonoidmengen produzieren, aber auch daran, dass der Propolisgehalt im Honig variiert und damit auch die Konzentrationen der darin enthaltenen Flavonoide.

Die Flavonoidkonzentrationen lagen im Bereich von ca. 1,5 bis 235 µg/100 g Honig. In keiner der Proben konnte Myricetin nachgewiesen werden. Hesperetin wurde, in Übereinstimmung mit der Literatur, nur in Zitrushonigen gefunden. Kürbis- und Melonenhonig wiesen sehr ähnliche Flavonoidprofile auf. Sie zeichneten sich durch einen hohen Kämpferolgehalt aus. Die hohen Galanginkonzentrationen in Kirschblüten-, Phacelia-, Löwenzahn-, Rosmarin- und Ahornhonig weisen auf erhebliche Propolisgehalte hin.

8.2 Abstract

Nectar and honeydew collected by the bees contain flavonoids, which are typical for their plant origin. The profile of the flavonoid fraction therefore connected to the botanical origin of the raw material could and thus be used for the identification of honey.

Aim of this thesis was the development of an analytical method for the separation and detection of flavonoids from honey, based on high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a coulometric electrode array detector (CEAD) after accelerated solvent extraction (ASE).

As no satisfactory extraction of the flavonoids from honey could be achieved with ASE, the extraction method with the nonionic polymeric resin Amberlite XAD-2, used in most previous studies was employed to isolate the phenolic fraction. Because of the selectivity of the employed detection method, the usual clean-up step (extraction with diethylether) was not necessary. The following separation of the flavonoids was done by reversed phase-HPLC with a gradient elution program with eluents of 20% methanol in 20 mM phosphate buffer (adjusted to pH 3,2 with o-phosphoric acid, 85%) and 80% methanol in 20 mM phosphate buffer (pH 3,2 with o-phosphoric acid, 85%). Detection was done by CEAD at six potentials between +300 und +800 mV. Quantification was carried out by measuring the peak heights. The intra-day- and inter-day reproducibility of analysing a standard solution (1 mg/L) and a honey sample (BioOrange) ranged between 1,9 to 4,3% and 3,9 to 7,3 % and between. 2,6 to 5,8% and 4,3 to 9,9%, respectively.

The LOD (S/N=3) and LOQ (S/N=10) for the flavonoids in a standard solution ranged between 4 to 18 µg/L and 7 to 45 µg/L, in the honey samples between 1,6 - 8,2 µg/kg und 3,9 - 27 µg/kg respectively. The recovery was determined by standard addition and was above 96% in fluid honey and above 89% in creamy honey.

The different honey samples showed diverse flavonoid patterns. It cannot be stated, that this patterns are typical for different kinds of honey, since only one sample of each type was tested several times. In some cases, the obtained data were different to those found in literature, but literature values also vary from one study to the other. This could be due to the fact that plants produce different amounts

of flavonoids under distinct environmental circumstances or because of varying amounts of propolis, which also contains flavonoids, incorporated in honey.

Concentrations of the flavonoids ranged from about 1,5 to 235 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ honey. Myricetin could not be detected in any sample. Hesperetin was confirmed as a marker for citrus honey. Pumpkin and melon honey showed very similar flavonoid patterns. They are distinguished from other honeys by a high kaempferol content. High galangin concentrations in cherry blossom, phacelia, dandelion, rosemary and maple honey indicate considerable propolis amounts in the honey samples.

8.3 Lebenslauf

Name: Karoline Petrus
Geburtsdatum: 29.12.1981
Adresse: Mühlgasse 8
2294 Groißenbrunn, NÖ
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung:

09/1988 – 06/1992 Volksschule Engelhartstetten, NÖ

09/1992 – 06/2000 BG und BRG Konrad Lorenz Gymnasium Gänserndorf
Abschluss mit Matura 06/2000

seit 10/2000 Studium der Chemie an der Universität Wien, Fakultät für Chemie mit den Schwerpunkten Lebensmittelchemie und Anorganische Chemie

Arbeitserfahrung:

10/2008 – 02/2009 Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie
Tutorin, Lehrveranstaltung „Lebensmittelanalytisches Praktikum“

03/2009 – 07/2009 Universität Wien, Fakultät für Chemie, Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie
Tutorin, Lehrveranstaltung „Lebensmittelchemisches Praktikum A“

Praktikumserfahrung:

08/2003	Baxter, Orth/Donau Abteilung Experimental Virology <i>Ferialpraktikum</i>
09/2005	Römerquelle, Edelstal Mikrobiologisches Labor <i>Ferialpraktikum</i>
08 – 09/2006	Frenzel*** Austria Frost GmbH Chemisches und mikrobiologisches Labor <i>Ferialpraktikum</i>
08 – 09/2007	Frenzel*** Austria Frost GmbH Chemisches und mikrobiologisches Labor <i>Ferialpraktikum</i>

sonstige Kenntnisse:

EDV	Microsoft Office Erfahrung bei der Recherche in Datenbanken
Sprachen	Englisch in Wort und Schrift Französisch – Schulkenntnisse

8.4 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Aca	Acacetin
ACN	Acetonitril
Api	Apigenin
API	Atmospheric Pressure Ionisation
ASE	Accelerated Solvent Extraction
bidest. H ₂ O	bidestilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CE	Capillary electrophoresis
CEAD	Coulometrischer Elektroden-Array-Detektor
Chr	Chrysin
CI	Chemical Ionisation
CS	Corn Sirup
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
DAD	Diodenarray-Detektor
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
EI	Electron Ionisation
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ESI	Electrospray Ionisation
EU	Europäische Union
FAB	Fast Atom Bombardement
FD	Field Desorption
FI	Field Ionisation
FT	Fourier Transformed
g	Gramm
Gal	Galangin
GC	Gaschromatographie
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
Hes	Hesperetin

HFCS	High Fructose Corn Syrup
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	Ionenchromatographie
Irh	Isorhamnetin
IS	Invert Sugar
Kä	Kämpferol
kg	Kilogramm
km	Kilometer
konz.	konzentriert
L	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
Lut	Luteolin
m	Meter
M	molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MECC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
mV	Millivolt
Myr	Myricetin
nA	Nanoampere
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaOH	Natriumhydroxid
Nar	Naringenin
NH ₃	Ammoniak
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

PC	Pinocembrin
PI	Photo Ionisation
Qu	Quercetin
ROS	Reactive Oxygen Species
RP	Reversed Phase
S/N	Signal/Noise-ratio
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
SIRA	Stable Isotopic Ratio Analysis
SPE	Solid Phase Extraction
SSMS	Spark Source Mass Spectrometry
TFA	Trifluoressigsäure (Trifluoroacetic Acid)
TIC	Total Ion Chromatogram
TLC	Thin Layer Chromatography
TOF	Time of Flight
TSI	Thermospray Ionisation
u.v.m.	und viele(s) mehr
v/v	volume/volume
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer

8.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flavankern.....	9
Abbildung 2: Grundstruktur der Flavone	11
Abbildung 3: Grundstruktur der Flavonole.....	11
Abbildung 4: Grundstruktur der Flavanone	12
Abbildung 5: Grundstruktur der Catechine	12
Abbildung 6: Grundstruktur der Anthocyane	13
Abbildung 7: Grundstruktur der Isoflavone.....	13
Abbildung 8: Strukturformel von Myricetin.....	22
Abbildung 9: Strukturformel von Quercetin	23
Abbildung 10: Strukturformel von Naringenin.....	23
Abbildung 11: Strukturformel von Luteolin	24
Abbildung 12: Strukturformel von Hesperetin.....	24
Abbildung 13: Strukturformel von Kämpferol.....	24
Abbildung 14: Strukturformel von Isorhamnetin	25
Abbildung 15: Strukturformel von Apigenin.....	25
Abbildung 16: Strukturformel von Pinocembrin	26
Abbildung 17: Strukturformel von Chrysin.....	26
Abbildung 18: Strukturformel von Galangin.....	27
Abbildung 19: Strukturformel von Acacetin	27
Abbildung 20: ASE-100, Dionex [81].....	58
Abbildung 21: Polystyrol-Divenylbenzol-Grundgerüst [83].....	59
Abbildung 22: Struktur eines hydrophoben Amberlite XAD-2-Harz-Kügelchens [82]	60
Abbildung 23: Aufbau eines HPLC-Systems [84].....	62
Abbildung 24: Darstellung zweier Durchflusselektroden eines CEAD-Systems (modifiziert aus [86]) .	69
Abbildung 25: Aufbau eines Massenspektrometers [89].....	72
Abbildung 26: Ionenbildung bei Sprayverfahren [90]	73
Abbildung 27: Tröpfchenbildung bei ESI [91].....	73
Abbildung 28: Schematische Darstellung einer Ionenfalle [92].....	75
Abbildung 29: CEAD-Chromatogramm einer Flavonoid-Standardmischung aus Myricetin (Myr), Quercetin (Qu), Naringenin (Nar), Luteolin (Lut), Hesperetin (Hes), Kämpferol (Kä), Isorhamnetin (Irh) und Galangin (Gal). Die Konzentration der Flavonoide betrug je 1 mg/L.	102
Abbildung 30: Strom-Spannungskurven einer Standardlösung (1 mg/L) (A) von Quercetin (Qu), Kämpferol (Kae) und Galangin (Gal); (B) von Myricetin (Myr), Naringenin (Nar) und Isorhamnetin (Irh) und (C) von Luteolin (Lut) und Hesperetin (Hes)	104
Abbildung 31: Kalibrierfunktionen der Flavonoid-Standardmischungen (c=0,01-2 mg/L).....	105
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Analysenmethode	113
Abbildung 33: CEAD-Chromatogramm einer Bio-Orangenhonig-Probe	115

Abbildung 34: Ermittlung der Wiederfindung von Hesperetin in Bio-Orangenhonig mittels Standardaddition	116
Abbildung 35: Wiederfindung der Flavonoide in Creme- und flüssigem Honig.....	117
Abbildung 36: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Bio-Orangenhonig-Probe	119
Abbildung 37: CEAD-Chromatogramm einer Bio-Orangenhonig-Probe mit 100%igem Flavonoid-zusatz	120
Abbildung 38: CEAD-Chromatogramm einer ungespikten Salbeihonig-Probe.....	120
Abbildung 39: CEAD-Chromatogramm einer Salbeihonig-Probe mit 100%igem Flavonoidzusatz	121
Abbildung 40: CEAD-Chromatogramm einer Kirschblütenhonig-Probe	121
Abbildung 41: CEAD-Chromatogramm einer Lavendelhonig-Probe.....	122
Abbildung 42: CEAD-Chromatogramm einer Phaceliahonig-Probe.....	122
Abbildung 43: CEAD-Chromatogramm einer Rhododendronhonig-Probe	123
Abbildung 44: CEAD-Chromatogramm einer Rapshonig-Probe.....	123
Abbildung 45: TIC- und EIC-Chromatogramme: (A) TIC der Bio-Orangenhonigprobe, (B) EIC der Standardmischung bei 319,2 m/z, (C) EIC des Honigs bei 319,2 m/z, (D) EIC der Standardmischung bei 303,2 m/z, (C) EIC des Honigs bei 303,2 m/z	127
Abbildung 46: (A) EIC-Chromatogramm der Standardmischung bei 303,2 m/z, (B) Massenverteilung des Peaks bei $t_R=43,2$ min (Quercetin), (C) Massenverteilung des Peaks bei $t_R=49,2$ min (Hesperetin)	128
Abbildung 47: (A) EIC-Chromatogramm des Bio-Orangenhonigs bei 303,2 m/z, (B) Massenverteilung des Peaks bei $t_R=43,4$ min (Quercetin), (C) Massenverteilung des Peaks bei $t_R=49,6$ min (Hesperetin)	128
Abbildung 48: Überblick über die Flavonoidmuster der untersuchten Honigproben.....	131
Abbildung 49: Vergleich der Flavonoidkonzentrationen in den untersuchten Honigen.....	133

8.6 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Honigzusammensetzung [5]</i>	30
<i>Tabelle 2: Qualitätskriterien [1, 2]</i>	41
<i>Tabelle 3: HPLC-Methoden zur Auftrennung von Flavonoiden in Honig</i>	54
<i>Tabelle 4: Zusammensetzung verschiedener Laufmittelgemische zur Ermittlung eines geeigneten Elutionsmittels</i>	88
<i>Tabelle 5: Elutionsmittel zur Entwicklung einer Gradientenmethode</i>	89
<i>Tabelle 6: Elutionsmittel zur Entwicklung einer alternativen Gradientenmethode</i>	90
<i>Tabelle 7: Zur Auswertung verwendeter Detektionskanal</i>	91
<i>Tabelle 8: ASE-Parameter</i>	93
<i>Tabelle 9: MS-Parameter</i>	100
<i>Tabelle 10: Rechnerisch und experimentell bestimmte Nachweisgrenzen der einzelnen Flavonoide</i> 106	
<i>Tabelle 11: Intraday- und Interday-Reproduzierbarkeit einer Standardmischung</i>	107
<i>Tabelle 12: Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse</i>	109
<i>Tabelle 13: Wiederfindung der Flavonoide in Bio-Orangenhonig nach Extraktion mittels ASE</i>	110
<i>Tabelle 14: Wiederfindung der Flavonoide in Bio-Orangenhonig nach Extraktion mittels Polyamid</i> ..	111
<i>Tabelle 15: Wiederfindung (N=5) der Flavonoide in Creme- und flüssigem Honig</i>	117
<i>Tabelle 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Flavonoide in einer Bio-Orangenhonigprobe</i>	118
<i>Tabelle 17: Intraday- und Interday-Reproduzierbarkeit bestimmt an einer Bio-Orangenhonigprobe</i> .	118
<i>Tabelle 18: Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse der Analyse von Honigproben (n.d. ... nicht detektiert)</i>	125
<i>Tabelle 19: Massen der Moleküle der Flavonoide</i>	126
<i>Tabelle 20: Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels HPLC-MS</i>	129
<i>Tabelle 21: Flavonoidkonzentrationen der analysierten Honigproben (n.d. ... nicht detektiert)</i>	130
<i>Tabelle 22: Ermittelte Flavonoidkonzentrationen in µg/100 g (n.d. ... nicht detektiert)</i>	136
<i>Tabelle 23: In der Literatur ermittelte Flavonoidmuster bzw. -konzentrationen von sortenreinen Honigproben (Angaben in µg/100 g; + steht für identifiziert, - für nicht nachgewiesen)</i>	137

8.7 Literaturverzeichnis

1. BMGF (2004) *Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über Honig (Honigverordnung)*. BGBl. II Nr. 40/2004
2. Rat der Europäischen Union (2002) *Richtlinie 2001/110/EG des Rates vom 20. Dezember 2001 über Honig*. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft
3. Cook, N.C., Samman, S. (1996) *Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. Nutritional Biochemistry. **7**: p. 66-76.
4. Havsteen, B.H. (2002) *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. Pharmacology & Therapeutics. **96**: p. 67-202.
5. Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2008) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie, sechste vollständig überarbeitete Auflage*. Springer Verlag, p. 847-862, 912-919.
6. Pietta, P.-G. (2000) *Flavonoids as Antioxidants*. J. Nat. Prod. **63**: p. 1035-1042.
7. Clifford, M., Brown, J.E. (2006) *Dietary Flavonoids and Health - Broadening the Perspective*, in *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*, O.M. Andersen and K.R. Markham, Editors. CRC Press. p. 319-370.
8. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997) *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science. **2**(4): p. 152-159.
9. Hollman, P.C., Arts, I.C. (2000) *Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden*. J. Sci. Food Agric. **80**: p. 1081-1093.
10. Watzl, B., Rechkemmer, G. (2001) *Flavonoide*. Ernährungs-Umschau. **48**(12): p. 498-502.
11. Kyle, J.A.M., Duthie, G.G. (2006) *Flavonoids in Foods*, in *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*, O.M. Andersen and K.R. Markham, Editors. CRC Press. p. 219-262.
12. Peterson, J., Dwyer, J. (1998) *Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity*. Nutrition Res. **18**(12): p. 1995-2018.
13. Gould, K.S., Lister, C. (2006) *Flavonoid Functions in Plants*, in *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*, O.M. Andersen and K.R. Markham, Editors. CRC Press. p. 397-441.
14. Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000) *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochem. **55**: p. 481-504.
15. Wikipedia. (2009) *Naringenin*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Naringenin> [Online Resource, abgerufen am 04.02.2009].
16. Lebensmittellexikon. *Myricetin*. Lebensmittelwissen.de. <http://www.lebensmittelwissen.de/lexikon/m/myricetin.php> [Online Resource, abgerufen am 04.02.2009].
17. Wikipedia. (2009) *Quercetin*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin> [Online Resource, abgerufen am 04.02.2009].
18. Phytochemicals. *Isorhamnetin*. <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/isorhamnetin.php> [Online Resource, abgerufen am 04.02.2009].
19. Wikipedia. (2009) *Chrysin*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chrysin> [Online Resource, abgerufen am 04.02.2009].

20. Baltes, W. (2000) *Lebensmittelchemie, fünfte, vollständig überarbeitete Auflage*. Springer-Verlag, p. 348, 349.
21. Konsumenteninformation, Verein für (2003) *Honig & Co Es muss nicht immer Zucker sein*. Konsument, **12**
22. Konsumenteninformation, Verein für (2007) *Honig - Auf der süßen Seite*. Konsument, **1**
23. Bogdanov, S., Martin, P. (2002) *Honey Authenticity: a review*. Swiss Bee Research Centre. http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/miel/miel_autenticidad_review_alteraciones.pdf [Online Resource, abgerufen am 19.01.2009].
24. Wikipedia. (2008) *Honey*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Honey> [Online Resource, abgerufen am 14.10.2008].
25. Al-Qassemi, R., Robinson, R.K. (2003) *Some special nutritional properties of honey – a brief review*. Nutrition & Food Science. **33**(6): p. 254-260.
26. Guerrini, A., Bruni, R., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Scalvenzi, L., Sacchetti, G. (2009) *Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product*. Food Chem. **114**: p. 1413-1420.
27. Vit, P., Soler, C., Tomás-Barberán, F.A. (1997) *Profiles of phenolic compounds of Apis mellifera and Melipona spp. honeys from Venezuela*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. **204**: p. 43-47.
28. Vit, P., Tomás-Barberán, F.A. (1998) *Flavonoids in Meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical and entomological origin to assess their putative anticataract activity*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A. **206**: p. 288-293.
29. Wikipédia. (2009) *Miel*. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Miel> [Online Resource, abgerufen am 04.02.2009].
30. Wögerer, J. (2003) *Die Bedeutung des Honigs in unserer Ernährung*. Diplomarbeit an der Fakultät für Naturwissenschaften und Mathematik, Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien p. 6-63
31. Anklam, E. (1998) *A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey*. Food Chem. **63**(4): p. 549-562.
32. National Honey Board. (2005) *HONEY - A reference guide to nature's sweetener*. National Honey Board. <http://www.honey.com/downloads/refguide.pdf> [Online Resource, abgerufen am 19.01.2009].
33. Herold, E., Leibold, G. (1996) *Heilwerte aus dem Bienenvolk*. 15. Ehrenwirth Verlag, München p. 70-122, 129, 191-194.
34. Volpi, N. (2004) *Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis*. Electrophoresis. **25**: p. 1872-1878.
35. Zugravu, C.-A., Patrascu, D., Pârvu, M., Dinu, C. (2008) *Honey: Some food safety problems in Romania*. J. Agroalimentary Processes and Technologies. **14**: p. 261-265.
36. Bogdanov, S. (2006) *Contaminants of bee products*. Apidologie. **37**: p. 1-18.
37. Fernández Muino, M.A., Sancho, M.T., Simal Gándara, J., Créus Vidal, J.M., Huidobro, J.F., Simal Lozano, J. (1995) *Organochlorine pesticide residues in Galician (NW Spain) honeys*. Apidologie. **26**: p. 33-38.

38. Wilczynska, A., Przybylowski, P. (2007) *Residues of Organochlorine Pesticides in Polish Honeys*. *Apiacta*. **42**: p. 16-24.
39. Choudhary, A., Sharma, D.C. (2008) *Pesticide Residues in Honey Samples from Himachal Pradesh (India)*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **80**: p. 417-422.
40. Bogdanov, S., Blumer, P. (2001) *Propriétés antibiotiques naturelles du miel*. Centre suisse de recherches apicoles. http://ddsv71.agriculture.gouv.fr/espace_abeille/documents/Effet%20antibio%20du%20miel.pdf [Online Resource, abgerufen am 04.02.2008].
41. Efem, S.E.E. (1998) *Clinical observations on the wound healing properties of honey*. *Br. J. Surg.* **75** (July): p. 679-681.
42. Jeffrey, A.E., Echazarreta, C.M. (1996) *Medical uses of honey*. *Rev Biomed.* **7**: p. 43-49.
43. Gheldof, N., Engeseth, N.J. (2002) *Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources Based on the Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and Inhibition of in Vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples*. *J. Agric. Food Chem.* **50**: p. 3050-3055.
44. Gheldof, N., Wang, X.-H., Engeseth, N.J. (2002) *Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources*. *J. Agric. Food Chem.* **50**: p. 5870-5877.
45. Zunin, P., Calcagno, C., Evangelisti, F. (1987) *L'analisi chimico-bromatologica nel controllo della genuinità del miele*. *Rivista Italiana di Scienze Alimentari*. **16**: p. 317-322.
46. Jörg, E., Sontag, G. (1992) *Determination of phenolic acids in honey by HPLC using coulometric dual electrode detection*. *Deutsche Lebensmittelrundschau*. **88**: p. 179-183.
47. Ferreres, F., Andrade, P., Tomás-Barberán, F.A. (1996) *Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar*. *J. Agric. Food Chem.* **44**: p. 2053-2056.
48. Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., Tomás-Barberán, F.A. (1993) *Hesperetin: a marker for the floral origin of citrus honey*. *J. Sci. Food Agric.* **61**: p. 121-123.
49. Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Tomás-Lorente, F. (1991) *An HPLC technique for flavonoid analysis in honey*. *J. Sci. Food Agric.* **56**: p. 49-56.
50. Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Soler, C., García-Viguera, C., Ortiz, A., Tomás-Lorente, F. (1994) *A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis*. *Apidologie*. **25**: p. 21-30.
51. Iurlina, M.O., Saiz, A.I., Fritz, R., Manrique, G.D. (2009) *Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys*. *Food Chem.* **115**: p. 1141–1149.
52. Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. (1997) *Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis*. *J. Agric. Food Chem.* **45**: p. 2824-2829.
53. Andrade, P., Ferreres, F., Gil, I., Tomás-Barberán, F.A. (1997) *Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis*. *Food Chem.* **60**(1): p. 79-84.
54. Delgado, C., Tomás-Barberán, F.A., Talou, T., Gaset, A. (1994) *Capillary Electrophoresis as an Alternative to HPLC for Determination of Honey Flavonoids*. *Chromatographia*. **38**(1/2): p. 71-78.

55. Soler, C., Gil, M.I., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F.A. (1995) *Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin*. *Apidologie*. **26**: p. 53-60.
56. Gil, M.I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E., Tomás-Barberán, F.A. (1995) *Plant Phenolic Metabolites and Floral Origin of Rosemary Honey*. *J. Agric. Food Chem.* **43**: p. 2833-2838.
57. Martos, I., Ferreres, F., Yao, L., D'Arcy, B., Caffin, N., Tomás-Barberán, F.A. (2000) *Flavonoids in Monospecific Eucalyptus Honeys from Australia*. *J. Agric. Food Chem.* **48**: p. 4744-4748.
58. Tomás-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E. (2001) *HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys*. *J Sci Food Agric.* **81**: p. 485-496.
59. Yao, L., Jiang, Y., D'Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K. (2004) *Quantitative High-Performance Liquid Chromatography Analyses of Flavonoids in Australian Eucalyptus Honeys*. *J. Agric. Food Chem.* **52**(2): p. 210-214.
60. Ferreres, F., Juan, T., Pérez-Arquillué, C., Herrera-Marteache, A., García-Viguera, C., Tomás-Barberán, F.A. (1998) *Evaluation of Pollen as a Source of Kaempferol in Rosemary Honey*. *J. Sci. Food Agric.* **77**: p. 506-510.
61. Fiorani, M., Accorsi, A., Blasa, M., Diamantini, G., Piatti, E. (2006) *Flavonoids from Italian Multifloral Honeys Reduce the Extracellular Ferricyanide in Human Red Blood Cells*. *J. Agric. Food Chem.* **54**: p. 8328-8334.
62. Kenjeric, D., Mandic, M.L., Primorac, L., Bubalo, D., Perl, A. (2007) *Flavonoid profile of Robinia honeys produced in Croatia*. *Food Chem.* **102**: p. 683-690.
63. Kenjeric, D., Mandic, M.L., Primorac, L., Čačić, F. (2008) *Flavonoid pattern of sage (Salvia officinalis, L.) unifloral honey*. *Food Chem.* doi: [10.1016/j.foodchem.2008.01.031](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.031): p. Online-Resource, abgerufen am 8.10.2008.
64. Martos, I., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A. (2000) *Identification of Flavonoid Markers for the Botanical Origin of Eucalyptus Honey*. *J. Agric. Food Chem.* **48**: p. 1498-1592.
65. Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., Martos, I., Singanusong, R. (2003) *Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand Leptospermum honeys*. *Food Chem.* **81**: p. 159-168.
66. Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., D'Arcy, B., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K. (2004) *Flavonoids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication*. *Food Res. Int.* **37**: p. 166-174.
67. Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006) *Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry*. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis.* **41**: p. 1648-1656.
68. Baltrusaityte, V., Venskutonis, P.R., Ceksteryte, V. (2007) *Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts*. *Food Chem.* **101**: p. 502–514.
69. Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Piatti, E. (2007) *Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells*. *Food Chem.* **104**: p. 1635-1640.

70. Ceksteryte, V., Kazlauskas, S., Racys, J. (2006) *Composition of flavonoids in Lithuanian honey and beebread*. *Biologija*. **2**: p. 28-33.
71. Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretera, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006) *Problems of quantitative and qualitative estimation of polyphenols in honey by capillary electrophoresis with UV-vis detection*. *AgroFOOD industry hi-tech*. **17**(4 July/August 2006): p. 68-72.
72. Truchado, P., Ferreres, F., Bortolotti, L., Sabatini, A.G., Tomás-Barberán, F.A. (2008) *Nectar Flavonol Rhamnosides Are Floral Markers of Acacia (Robinia pseudacacia) Honey*. *J. Agric. Food Chem.* **56**: p. 8815–8824.
73. Weston, R.J., Mitchell, K.R., Allen, K.L. (1999) *Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey*. *Food Chem.* **64**: p. 295-301.
74. Weston, R.J., Brocklebank, L.K., Lu, Y. (2000) *Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys*. *Food Chem.* **70**: p. 427-435.
75. Michalkiewicz, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K. (2008) *Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey*. *J. Chromatogr. A*. **1187**: p. 18-24.
76. Pulcini, P., Allegrini, F., Festuccia, N. (2006) *Fast SPE extraction and LC-ESI-MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey*. *Apiacta*. **41**: p. 21-27.
77. Pichichero, E., Canuti, L., Canini, A. (2009) *Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin*. *J. Sci. Food Agric.* **89**: p. 609–616.
78. Amiot, M.J., Aubert, S., Gonnet, M., Tacchini, M. (1989) *Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles*. *Apidologie*. **20**(2): p. 115-125.
79. Liang, Y., Cao, W., Chen, W.-J., Xiao, X.-H., Zheng, J.-B. (2009) *Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection*. *Food Chem.* **114**: p. 1537–1541.
80. Siess, M.-H., LeBon, A.-M., Canivenc-Lavier, M.-C., Amiot, M.-J., Sabatier, S., Aubert, S.Y., Suschetet, M. (1996) *Flavonoids of Honey and Propolis: Characterization and Effects on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Benzo[a]pyrene-DNA Binding in Rats*. *J. Agric. Food Chem.* **44**: p. 2297-2301.
81. Dionex (2002) *ASE 100 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual*.
82. Supelco, *Product Specification: Amberlite XAD-2 Polymeric Adsorbent*. 1997, Sigma-Aldrich.
83. Fontanals, N., Marcé, R.M., Borrull, F. (2005) *New hydrophilic materials for solid-phase extraction*. *Trends Analytical Chem.* **4**(5): p. 394-406.
84. Otto, M. (2000) *Analytische Chemie*. 2. Wiley-VCH, p. 413-430, 452-474.
85. Skoog, D.A., Leary, J.J. (1996) *Instrumentelle Analytik - Grundlagen, Geräte, Anwendungen*. Springer-Verlag, p. 455-497, 621-647, 675-702, 762, 763.
86. Acworth, I.N., Naoi, M., Parvez, H., Parvez, S. (1997) *Coulometric electrode array detectors for HPLC*. *Progress in HPLC-HPCE*. VSP BV, p. 3-107.
87. Buchberger, W. (1998) *Elektrochemische Analyseverfahren: Grundlagen, Instrumentation, Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, p. 199-237.

88. Budzikiewicz, H. (1998) *Massenspektrometrie. Eine Einführung*. 4. Auflage. Wiley-VCH, p. 9-44.
89. Online-Resource <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/proteomics/images/bildmsbauelemente.jpg>. [Online Resource, abgerufen am 16.06.2009].
90. Online-Resource. <http://bopwww.biologie.uni-freiburg.de/research/ESI1mono.gif>. [Online Resource, abgerufen am 16. 06. 2009].
91. Online-Resource http://www.ich.ucl.ac.uk/services_and_facilities/lab_services/mass_spectrometry/images/HPLC_ESI_MS_1.gif. [Online Resource, abgerufen am 16.06.2009].
92. Online-Resource <http://www.nature.com/nrd/journal/v2/n2/images/nrd1011-f4.gif>. [Online Resource, abgerufen am 16.06.2009].
93. Volpi, N., Bergonzini, G. (2006) *Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry*. J. Pharmaceut. Biomed. Analysis. **42**: p. 354-361.